

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 11 月 7 日 (07.11.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/088186 A1

(51) 国際特許分類: C07K 16/28, C12N  
15/13, 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00,  
37/04, 37/06, 37/08, 7/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/04292

(22) 国際出願日: 2002 年 4 月 26 日 (26.04.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
PCT/US01/13672

2001 年 4 月 27 日 (27.04.2001) US  
特願 2001-142482 2001 年 5 月 11 日 (11.05.2001) JP  
特願 2001-310535 2001 年 10 月 5 日 (05.10.2001) JP  
10/040,244 2001 年 10 月 26 日 (26.10.2001) US

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 麒麟  
麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)  
[JP/JP]; 〒104-8288 東京都中央区新川二丁目 10 番  
1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 三箇山 俊文  
(MIKAYAMA, Toshifumi) [JP/US]; 92121 カリフォル  
ニア州 サンディエゴサイエンスセンタードライ  
ブ 10355 ジェミニサイエンス研究所内 CA (US). 吉  
田 均 (YOSHIDA, Hitoshi) [JP/US]; 92121 カリフォル  
ニア州 サンディエゴサイエンスセンタードライ  
ブ 10355 ジェミニサイエンス研究所内 CA (US). フォース  
ウォーカーアール (FORCE, Walker R) [US/US]; 92121

カリフォルニア州 サンディエゴサイエンスセンター  
ドライブ 10355 ジェミニサイエンス研究所内 CA (US).  
チェンシンジエ (CHEN, Xingjie) [CN/US]; 94041 カリ  
フォルニア州 マウンテンビュー ヴィラ ストリ  
ート 1107 CA (US). 高橋 信明 (TAKAHASHI, Nobuaki)  
[JP/JP]; 〒370-1295 群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟  
麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒  
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5  
森ビル 3 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,  
ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特  
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTI-CD40 MONOCLONAL ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗 CD40 モノクローナル抗体

(57) Abstract: An antibody having agonism or antagonism to CD40 or its functional fragment.

(57) 要約:

CD40 に対し、アゴニスティックに又はアンタゴニスティックに作用する抗体又  
はその機能的断片。

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/088186 A1

## 明 細 書

## 抗 CD40 モノクローナル抗体

## 技術分野

本発明は、ヒトの B 細胞、樹状細胞 (DC) 等の表面に存在するヒト CD40 抗原を認識する抗体又はその機能的断片に関する。具体的には、本発明は樹状細胞 (DC) 表面のヒト CD40 抗原に対して実質的にアンタゴニスティックである抗ヒト CD40 抗体又はその機能的断片、および従来の抗ヒト CD40 抗体に比べてより治療効果の高いことが期待されるアゴニスティックな抗ヒト CD40 抗体又はその機能的断片に関する。

## 背景技術

## 1. CD40

CD40 は分子量 50kDa の細胞膜表面に存在する抗原であり、B 細胞、樹状細胞 (DC)、ある種の癌細胞、そして胸腺上皮細胞に発現している。CD40 は B 細胞や DC の増殖、分化に重要な働きをしていることが知られている。CD40 は、ヒト B 細胞表面に発現する抗原として同定され (E. A. Clark et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986, I. Stamenkovic et. al., EMBO J. 8:1403, 1989)、アミノ酸配列の相同性から、CD40 は、低親和性 NGF レセプターや TNF レセプター、CD27、OX40、CD30 などが属している TNF レセプターファミリーの 1 つのメンバーとして考えられている。ヒトおよびマウスの CD40 に対するリガンド (CD40L) は、近年遺伝子クローニングされ、II 型膜蛋白質であること、及び活性化した CD4+T 細胞に発現していることが分かった。CD40L は、強力な活性化シグナルをヒトおよびマウスの B 細胞に導入することも分かっている。

また、樹状細胞には B 細胞よりも多くの CD40 発現が確認されており、重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。CD40 が CD40L と結合すると、抗原提示細胞 (APC) の活性化、すなわち CD80 (B7-1) や CD86 (B7-2) などの補助刺激分子の発現、あるいは IL-12 の産生が増強される (Caux, C., et al.: Activation of

human dendritic cells through CD40 cross-linking. J. Exp. Med., 180:1263, 1994)、(Shu, U., et al.: Activated T cells induce interleukin-12 production by monocyte via CD40-CD40 ligand interaction. Eur. J. Immunol., 25:1125, 1995)。樹状細胞は強い抗原提示能を有し、強力なヘルパーT (Th) 細胞活性化能を持っている。また、ナイーブ (naive) Th 細胞の Th1 又は Th2 細胞への分化を樹状細胞が制御していると考えられている。ミエロイド系樹状細胞である末梢血単球を GM-CSF 及び IL-4 とともに培養して CD40L により成熟させた樹状細胞 (DC1) は in vitro において、IL-12 産生能を有し、異系 naive Th 細胞を刺激活性化し、IFN $\gamma$  産生 T 細胞を誘導する (すなわち Th1 への分化を促す)。この作用は抗 IL-12 抗体により阻害されることから、IL-12 を介した反応と考えられる。一方リンパ組織 T 領域や、末梢血に存在する plasmacytoid T 細胞を IL-3、CD40 リガンドとともに培養したリンパ球系樹状細胞 (DC2) は、IL-12 産生能は有さず、そして異系 naive Th 細胞を刺激活性化し、IL-4 産生 T 細胞を誘導し、Th2 への分化を促進することが示されている。Th1 細胞は細胞性免疫の活性化にかかわり、Th2 細胞は液性免疫能を高めると同時に細胞性免疫能の抑制に関与すると考えられている。Th1 細胞のヘルプで活性化された細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、細胞質内で増殖する病原体 (多くのウィルス、リステリア菌、結核菌、およびトキソプラズマ原虫など) や腫瘍細胞を除去することができる。

膜表面に発現した CD40 を認識する抗 CD40 モノクローナル抗体が、B 細胞に対していろいろな生物活性を示すことは示されてきた。抗 CD40 モノクローナル抗体は、CD40 と CD40L との相互作用に対してアゴニスティックなものと、アンタゴニスティックなものに大別される。

## 2. アゴニスティック抗体

アゴニスティック抗体の作用として、B 細胞の活性化が知られている。たとえば、抗 CD40 抗体が細胞接着を誘導する (Barrett et al., J. Immunol. 146: 1722, 1991; Gordon et al., J. Immunol. 140: 1425, 1988)、細胞の大きさを増進する (Gordon et al., J. Immunol. 140: 1425, 1988; Valle et al., Eur. J. Immunol. 19: 1463, 1989)、抗 IgM 抗体、抗 CD20 抗体または phorbol ester のみで活性化

された B 細胞の分裂を誘導する (Clark and Ledbetter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986; Gordon et al., LEUCOCYTE TYPING III. A. J. McMichael ed. Oxford University Press. Oxford, p.426; Paulie et al., J. Immunol. 142: 590, 1989)、IL4 存在下で B 細胞の分裂を誘導する (Valle et al., Eur. J. Immunol. 19: 1463, 1989; Gordon et al., Eur. J. Immunol. 17: 1535, 1987)、IL-4 刺激、T 細胞除去培養細胞の IgE (Jabara et al., J. Exp. Med. 172: 1861, 1990; Gascan et al., J Immunol. 147:8, 1991)、IgG、IgM (Gascan et al., J. Immunol. 147: 8, 1991) の発現を誘導する、IL-4 による B 細胞からの可溶性 CD23/FcεRII の分泌と (Gordon and Guy, Immunol. Today 8:339, 1987; Cairns et al., Eur. J. Immunol. 18: 349, 1988) 細胞上の発現増強 (Challa A, Allergy, 54: 576, 1999) をする、IL-6 の生産を促進する (Clark and Shu, J. Immunol. 145: 1400, 1990) ことが報告されている。さらには、CDw32+ 接着細胞存在下で、IL-4 及び抗 CD40 抗体を添加することにより、ヒト初代培養 B 細胞から、B 細胞クローンを樹立することや (Banheraue et al., Science 241:70, 1991)、胚中心の中心細胞のアポトーシスが、抗原レセプターの働きにかかわらず、CD40 を介して阻害されること (Liu et al., Nature 342: 929, 1989) が報告されている。以上のように CD40 は、ヒト B 細胞表面に発現する抗原として同定されたため、単離された抗体の多くは、主にヒト B 細胞に対する増殖分化誘導機能、癌細胞における細胞死誘導活性を指標に評価されてきた (Katira, A. et. al., LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossossman, et. al. eds. p. 547. Oxford University Press. Oxford, W. C. Flansow et. al., LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossossman, et. al. eds. p. 555. Oxford University Press. Oxford, J. D. Pound et. al., International Immunology, 11: 11, 1999, )。

抗 CD40 抗体が DC を成熟させることが示された (Z. H. Zhou et. al., Hybridoma, 18:471 1999)。さらに、抗原特異的 CD8T 細胞プライミングにおける CD4T 細胞の役割は、CD40-CD40L シグナリングを介した DC の活性化にあることが報告され、抗 CD40 モノクローナル抗体 (mAb) により、樹状細胞 (DC) の活性化における CD4 ヘルパー T 細胞の役割を代替できることが示された (Shoenberger, S. P., et. al.: T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L



interactions. *Nature*, 480, 1998)。また、マウスにおいて抗 CD40 抗体の投与により CD40 を発現する腫瘍細胞のみならず非発現腫瘍細胞からも生体を防御可能であることが示された (French, R. R., et. al.: CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nature Medicine*, 5, 1999)。

今まで報告されてきた抗体は DC 細胞に対する効果を指標に単離されているものは少ない。しかし DC 細胞の機能修飾という点からは、B 細胞に作用する抗体を選別したのでは、治療薬としては不十分である可能性が高い。マウス CD40 に対する抗体のモノクローナル抗体では、抗体の認識するエピトープによって、DC には反応するが血管内皮細胞には反応しないクローンと、逆に DC には反応しないが血管内皮細胞には反応するクローンとが存在すると報告されている (Van Den Berg, TK, et. al., *Immunology*, 88:294, 1996)。ヒト CD40 抗体に関してもエピトープによって DC への結合や作用の異なることが推測される。

抗 CD40 抗体又は CD40 リガンドにより CD40 を発現するリンパ腫細胞株の増殖を抑制し、細胞死を誘導できることが分かっている (Funakoshi S et al., *Blood*, 83: 2782, 1994)、(Funakoshi S et al., *Journal of Immunotherapy*, 19, 93, 1996)、(Z. H. Zhou et. al., *Hybridoma*, 18: 471 1999)、(Joseph A et al., *Cancer Research*, 60: 3225, 2000)。アゴニスティック抗体において興味深いことは、抗体の働きが CD40L の機能と必ずしも一致しないことである。B 細胞に対する活性化作用と B 細胞腫瘍に対する増殖抑制作用も、必ずしも一致しない。DC 活性化能と腫瘍細胞増殖抑制作用を併せ持つ抗体の開発が望ましい。また、アゴニスティック抗体の中には、CD40L の CD40 への結合を、阻害するものも、しないものも存在する (Challa A et al., *Allergy*, 54: 576, 1999)。例えば、G28-5 (ATCC No. HB-9110) の生産する抗体は CD40L と競合するため、CD40L との併用効果はない。抗体によって CD40 発現細胞の活性化の程度にも差がある。単独で弱いアゴニスティック活性を示す抗体でも、CD40 リガンドと併用することによって、CD40 リガンド単独による活性よりも、抗体存在下で活性が著しく促進する場合がある。逆に、単独でアゴニスティック活性を示す抗体でも、CD40 リガンドを阻害することによって、CD40 リガンド単独による活性よりも、抗体存在下での活性を低下さ

せてしまう場合がある (Pound et al., International Immunology, 11:11, 1999)。CD40 リガンドと競合しない抗体では、それ自身による腫瘍細胞の増殖抑制作用は弱くとも、CD40 リガンド存在下ではより強い増殖抑制ができることが示されている (Joseph A et al., Cancer Research, 60: 3225, 2000)。このことから、CD40 に結合し、それ自身で細胞増殖を抑制する抗体でありながら、CD40 リガンドの CD40 に対する結合は阻害しないような抗体を開発することが望ましい。このような特徴を生かすことにより、可溶性 CD40L よりも有効な治療薬を開発できる可能性がある。たとえば、可溶性 CD40L は CD40 と結合し活性化するが、同時に生体内に存在している CD40L の働きを抑制する。CD40L と競合しない抗体ならば、このようなことは起こらず、相乗効果により、より良い治療効果が期待できる。

### 3. アンタゴニスティック抗体

一方、上記のように、CD40 が免疫反応において重要な役割を担っていることから、CD40 とそのリガンドの結合を阻害することで、臓器移植時の免疫抑制や自己免疫疾患の治療薬が開発できると期待される。Sawada-Hase らは、クローン病患者の末梢血中の単球では CD40 を強く発現する細胞の割合が上昇していることを報告している。しかしながら、CD40 とそのリガンドの結合を阻害する抗体については、まだ良く分かっていない。そのような阻害性抗体は、たとえば、CD40 の機能解析や、CD40 の活性化が必要な疾患の治療に有効である可能性がある。また、CD40 リガンドに対する阻害抗体も、CD40 と CD40 リガンドとの結合が関与する疾患薬として有効である可能性が示されている。しかしながら、CD40L は活性化した血小板に発現するという報告 (V. Henn et. al., Nature 391: 591, 1998) があるため、抗 CD40L 抗体を治療薬として使った場合、血栓を引き起こす危険性が存在することが報告されている (T. Kawai et. al., Nat. Med. 6: 114, 2000)。このような観点から、CD40 とそのリガンドの結合を阻害する抗体治療薬としては、抗 CD40L 抗体よりも、むしろ CD40 に対する抗体の方が安全性に優れると期待できる。抗 CD40 抗体としては CD40L の CD40 への結合を抑制し、なおかつ、抗体自身が CD40 を活性化しないことが必要とされる。

ヒト CD40 に特異的に結合し、CD40L の CD40 への結合を抑制し、なおかつ、CD40

を活性化しない抗体についての報告は、過去に膨大な量の研究がなされてきたにもかかわらず、5D12 と命名されたマウス抗ヒト CD40 抗体のわずか 1 例のみである (J. Kwekkeboom et. Al., Immunology 79: 439, 1993) 。まして、B 細胞に対して中和活性を示す抗体が、DC 細胞に対しても同様に、CD40 リガンドの作用を中和できるかどうかは知られていなかった。さらに、ビオチン化した抗マウス CD40 抗体の作用が、アビジンでの架橋によって増強されることが報告されている (Johnson et al., Eur J Immunol, 24, : 1835, 1994)。本発明者は可溶性リガンドに予め遺伝子工学的に付与された、タグ (FLAG) に対する抗体 (M2) を用いて、可溶性 CD40 リガンドの B 細胞株 (Ramos 細胞) に対する作用を増強し、その中和活性を測定したところ、5D12 (ATCC No. HB-11339) がわずかにしか中和活性を示さないことを確認した。

本発明者は新たに、アンタゴニスト抗体である 5D12 が架橋によって、CD40L の非存在下であっても、抗体単独でアゴニスト活性を持つことを見出した。従来、マウス CD40 抗体の作用がビオチンとアビジン架橋によって増強されることが報告されている (Johnson et al., Eur J Immunol, 24, : 1835, 1994)。また、プレートに固相化した抗免疫グロブリン抗体を用いて、CD40 抗体を固相化することで、腫瘍細胞の増殖抑制活性が増加することが知られていたが、これは固相化による効果と考えられていた。しかし、培養液中に抗免疫グロブリン抗体を添加し、抗 CD40 抗体を架橋することによって、アンタゴニスティック抗体であってもアゴニスティック活性を示す可能性があることは知られていなかった。治療に用いる抗体に抗原性があれば、ヒトの体内で CD40 抗体に結合する抗体が生じ、CD40 抗体が架橋されることによって、あたかも CD40 リガンドのような活性を生じる、全く逆の作用が懸念される。したがって治療薬の安全性の点から、抗体の抗原性を低く押さえることが非常に重要であると考えられる。マウス抗体の可変領域の配列をもとに、ヒト化技術により、治療薬として開発する場合、ヒト化抗体は免疫原性があることが知られているため、投与後に抗ヒト化抗 CD40 抗体ができる可能性があり、アゴニスティック抗体となる危険がある。また抗原性が低くとも、抗体レセプター (FcR) によって抗 CD40 抗体が架橋される可能性もある。これらの点から、アンタゴニスティック抗体は、CD40 に特異的に結合し、CD40L の結合を抑

制し、かつ、架橋によっても CD40 を活性化しないヒト抗体であって、FcR への結合が弱いことが望ましいと考えられる。

#### 発明の開示

上述のように、近年 DC 細胞の機能解析が進み、CD40 は DC 細胞の働きを制御する、重要な遺伝子として認識され始めた。このような背景から、本発明は、DC 細胞を用いた評価系を採用することにより、樹状細胞 (DC) 表面のヒト CD40 抗原に対しても実質的にアンタゴニスティックである抗ヒト CD40 抗体又はその機能的断片、および従来の抗ヒト CD40 抗体に比べてより治療効果の高いことが期待されるアゴニスティックな抗ヒト CD40 抗体又はその機能的断片を提供することを目的とする。

本発明者らは、ヒト CD40 に対する抗体の作製に関して鋭意研究した結果、従来知られている抗 CD40 抗体に比して、より疾患への治療効果が高いと考えられる新規なアゴニスティック抗体、及びアンタゴニスティック抗体を作製することに成功し、本発明を完成した。すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 以下の (a) ~ (f) から選ばれる少なくとも 1 つの性質を有する、ヒト CD40 に対する抗体又はその機能的断片。

- (a) 樹状細胞に作用し、LPS 及び IFN $\gamma$  の存在下で IL-12 を生産させる
- (b) 樹状細胞に作用し、該樹状細胞を成熟させる活性が G28-5 抗体よりも高い
- (c) B 細胞樹立細胞株に対して、CD95 の発現を促進する活性が G28-5 抗体よりも高い
- (d) B 細胞樹立細胞株に対して増殖を抑制する活性が G28-5 抗体よりも高い
- (e) B 細胞樹立細胞株に対して細胞死を誘導する
- (f) CD40 リガンドの CD40 に対する結合を阻害しない

(2) 上記本発明の抗体又はその機能的断片は、樹状細胞の成熟が、20  $\mu$ g/ml 以下の濃度で行われるものである。また、B 細胞樹立細胞株に対して CD95 の発現の促進は、20  $\mu$ g/ml 以下の抗体濃度で行われる。B 細胞樹立細胞株としては、例えば Ramos 又は HS-Sulton が挙げられる。



(3) また、上記本発明の抗体又はその機能的断片は、 $1 \times 10^6$  個/ml の濃度の樹状細胞に、 $0.1 \mu\text{g/ml}$  以上の濃度の抗体が添加された場合は、 $100 \text{pg/ml}$  以上の IL-12 の生産をもたらすものであり、 $1 \mu\text{g/ml}$  以上の濃度の抗体が添加された場合は、 $1000 \text{pg/ml}$  以上、好ましくは  $10000 \text{pg/ml}$  以上の IL-12 の生産をもたらすものである。

(4) さらに、上記本発明の抗体又はその機能的断片は、B細胞樹立細胞株 (Ramos 細胞) に対する CD95 の発現促進が、抗体濃度  $0.01 \mu\text{g/ml}$  から  $10 \mu\text{g/ml}$  の範囲において、対照である G28-5 抗体の約 2 倍から 3 倍以上となるものである。例えば、抗体濃度  $0.01 \mu\text{g/ml}$  では、対照である G28-5 抗体の約 2 倍から 6 倍以上であり、抗体濃度  $0.1 \mu\text{g/ml}$  では、対照である G28-5 抗体の約 2 倍から 7 倍以上であり、抗体濃度  $1 \mu\text{g/ml}$  では、対照である G28-5 抗体の約 2 倍から 7 倍以上であり、そして抗体濃度  $10 \mu\text{g/ml}$  では、対照である G28-5 抗体の約 2 倍から 6 倍以上である。

(5) ハイブリドーマ KM302-1 (受託番号 FERM BP-7578)、KM341-1-19 (受託番号 FERM BP-7759)、2105 (受託番号 FERM BP-8024) または F1-102 (受託番号 ATCC PTA-3337) により生産される抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片。

名称	受託番号	寄託日	寄託先
KM302-1	FERM BP-7578	2001 年 5 月 9 日	独立行政法人産業技術 総合研究所 特許生物 寄託センター (茨城県 つくば市東 1 丁目 1 番 地 1 中央第 6)
KM341-1-19	FERM BP-7759	2001 年 9 月 27 日	
2105	FERM BP-8024	2002 年 4 月 17 日	
F1-102	ATCC PTA-3337	2001 年 4 月 24 日	アメリカ国立菌培養収 集所 (アメリカ合衆国 ヴァージニア州 20110-2209 マナサス 10801 ユニバーシティ ブルバード)

(6) 受託番号 ATCC PTA-3302 および ATCC PTA-3303 であるプラスミド DNA にそれぞれコードされる、ハイブリドーマ F2-103 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、受託番号 ATCC PTA-3304 および ATCC PTA-3305 であるプラスミド DNA にそれぞれコードされる、ハイブリドーマ F5-77 の産生する抗体の重鎖可

変領域および軽鎖可変領域、または受託番号 ATCC PTA-3306 および ATCC PTA-3307 であるプラスミド DNA にそれぞれコードされる、ハイブリドーマ F5-157 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の、マチュア部分のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片。

名称	受託番号	寄託日	寄託先
F2-103 重鎖 (F2-103-H)	ATCC PTA-3302	2001年4月19日	アメリカ国立菌培養収 集所(アメリカ合衆国 ヴァージニア州 20110-2209 マナサス 10801 ユニバーシティ ブルバード)
F2-103 軽鎖 (F2-103-L)	ATCC PTA-3303	2001年4月19日	
F5-77 重鎖 (F5-77-H)	ATCC PTA-3304	2001年4月19日	
F5-77 軽鎖 (F5-77-L)	ATCC PTA-3305	2001年4月19日	
F5-157 重鎖 (F5-157-H)	ATCC PTA-3306	2001年4月19日	
F5-157 軽鎖 (F5-157-L)	ATCC PTA-3307	2001年4月19日	

(7) 配列番号 28 および 30 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ KM341-1-19 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 32 および 34 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ 2105 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 36 および 38 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ 110 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 40 および 42 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ 115 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 52 および 54 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ KM643-4-11 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 60 および 62 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ F2-103 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、または配列番号 64 および 66 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ F5-77 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の、マチュア部分のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片。

(8) 配列番号 27 および 29 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ KM341-1-19 から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 31 および 33 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ 2105 から単離された核

酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 35 および 37 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ 110 から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 39 および 41 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ 115 から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 51 および 53 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ KM643-4-11 から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 59 および 61 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ F2-103 から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、または配列番号 63 および 65 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ F5-77 から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域の、マチュア部分のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片。

(9) 以下の (g) ~ (j) から選ばれる少なくとも 1 つの性質を有する、ヒト CD40 に対する抗体又はその機能的断片。

(g) CD40 に対するリガンドの作用を中和する

(h) B 細胞樹立細胞株上の CD40 に対するリガンドが CD40 発現細胞に与える影響の 1 つ以上を中和又は緩和し、かつ、抗免疫グロブリン抗体による架橋によって前記 B 細胞樹立細胞株上の CD40 に対するアゴニスティックな作用が 5D12 より弱い

(i) B 細胞樹立細胞株に対して、CD40 リガンドが、CD95 の発現を増加させる作用を緩和又は中和する

(j) 樹状細胞に発現する CD40 に対してアンタゴニスティックな作用を有する

(10) 上記 (9) の抗体又はその機能的断片は、飽和量の CD40L 発現細胞を添加した  $1 \times 10^6$  個/ml の濃度の Ramos 細胞に、 $0.1 \mu\text{g/ml}$  の濃度の抗体が添加された場合は、Ramos 細胞の CD95 の発現を対照の約 10% 以下に抑制しうるものであり、 $1 \mu\text{g/ml}$  の濃度の抗体が添加された場合は、Ramos 細胞の CD95 の発現が陰性コントロールと同レベルまで抑制されるものであり、 $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度の抗体が添加された場合は、Ramos 細胞の CD95 の発現が陰性コントロールと同レベルまで抑制されるものである。

(11) 上記 (9) の抗体又はその機能的断片は、インビトロにおいて、可溶性

CD40L ( $1\mu\text{g/ml}$ ) を添加した  $1 \times 10^5$  個の扁桃腺 B 細胞に、 $0.001\mu\text{g/ml}$  から  $10\mu\text{g/ml}$  の濃度の抗体が添加された場合に、扁桃腺 B 細胞の増殖が約 80 から 95 % 以上抑制されるものである。例えば、 $0.01\mu\text{g/ml}$  から  $10\mu\text{g/ml}$  の濃度の抗体が添加された場合は、扁桃腺 B 細胞の増殖が約 95 % 以上抑制されるものであり、特に、 $0.001\mu\text{g/ml}$  の濃度の抗体が添加された場合は、扁桃腺 B 細胞の増殖が約 80 % 以上抑制されるものである。

(12) ハイブリドーマ KM281-1-10 (受託番号 FERM BP-7579)、4D11 (受託番号 FERM BP-7758) または F4-465 (受託番号 ATCC PTA-3338) により生産される抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片。

名称	受託番号	寄託日	寄託先
KM281-1-10	FERM BP-7579	2001 年 5 月 9 日	独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)
4D11	FERM BP-7758	2001 年 9 月 27 日	
F4-465	ATCC PTA-3338	2001 年 4 月 24 日	アメリカ国立菌培養収集所、アメリカ合衆国ヴァージニア州 20110-2209 マナサス 10801 ユニバーシティブルバード

(13) 配列番号 44 および 46 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ KM281-1-10 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 48 および 50 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ 4D11 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、または配列番号 56 および 58 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ F4-465 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の、マチュア部分のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片。

(14) 配列番号 43 および 45 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ KM281-1-10 から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 47 および 49 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ 4D11 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、または配列番号 55 および 57 にそれぞ



れ示される、ハイブリドーマ F4-465 から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域の、マチュア部分のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片。

(15) 上記 (1) ~ (14) の抗体又はその機能的断片としては、ヒト抗体のものが挙げられる。

(16) 上記 (1) ~ (15) のいずれかの抗体又はその機能的断片を有効成分として含む医薬組成物。

(17) 上記 (1) ~ (8) のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む、免疫賦活化剤、抗腫瘍剤又は自己免疫疾患治療剤。

(18) 上記 (9) ~ (14) のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む、免疫抑制剤、自己免疫疾患治療剤、アレルギー治療剤又は血液凝固第 VIII 因子阻害症候群治療剤。

(19) ここで、本発明のモノクローナル抗体の認識するヒト CD 40 のエピトープは、ヒト CD 40 の一次アミノ酸配列から得られたオーバーラップする合成オリゴペプチドへの結合を調べるなどの周知の方法によって決定することができる (例えば Ed Harlow and David Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, 1988 Cold Spring Harbor Laboratory Press; US Patent No. 4708871)。ファージディスプレイによるペプチドライブラリーキット (New England Biolabs) をエピトープマッピングに用いることもできる。本発明は、上述した個々のハイブリドーマによって産生される抗体又はその機能的断片の認識するヒト CD 40 の新規なエピトープを認識する抗体又はその機能的断片をも包含する。

(20) 本発明はさらに、上述した個々のハイブリドーマから単離された、抗体の重鎖および/または軽鎖の少なくとも可変領域をコードする核酸 (RNA または cDNA)、該核酸を含むベクター、該核酸を保持する宿主細胞を提供する。

以下、本発明を詳細に説明する。本明細書は、本願の優先権の基礎である PCT 出願 PCT/US01/13672 (2001 年 4 月 27 日出願)、日本国特許出願 2001-142482 号 (2001 年 5 月 11 日出願)、日本国特許出願 2001-310535 号 (2001 年 10 月 5 日出願) 及び米国特許出願 USSN 10/040, 244 (2001 年 10 月 26 日出願) の明細書及び/又は図面

に記載される内容を包含する。

発明者らは、後述するように、B細胞上のCD40に対してアンタゴニスティックである公知のモノクローナル抗体5D12(ATCC No. HB-11339)が、DC細胞上のCD40に対してはアンタゴニスティックではなかったという知見を得た。さらに発明者は、CD40Lの作用をブロックするアンタゴニスティック抗体であっても、多くのモノクローナル抗体が抗免疫グロブリン抗体による架橋によって、それ自身がアゴニスティック活性を示してしまうことを見出した。

## 1. 定義

本明細書で使用する用語の定義は以下のとおりである。

本発明でいう「ヒトCD40」とは、クラークら(E. A. Clark et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986)又はスタメンコビックら(I. Stamenkovic et. al., EMBO J. 8:1403, 1989)により示されているアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味し、特にB細胞、DC、マクロファージ、内皮細胞、上皮細胞、あるいはそれらの腫瘍細胞表面に発現する抗原ポリペプチドである。

「抗CD40モノクローナル抗体」とは、細胞発現CD40、全長CD40又は部分長CD40に対するモノクローナル抗体のいずれをも意味するが、より好ましくはCD40の細胞外部分に結合し、CD40を発現している細胞にアゴニスティックまたはアンタゴニスティックな作用をもたらすモノクローナル抗体を意味する。

さらに、本発明で「抗体」とは、イムノグロブリンを構成する重鎖可変領域及び重鎖定常領域並びに軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域をコードする遺伝子(「抗体遺伝子」と総称する)に由来するものである。本発明の抗体には、いずれのイムノグロブリンクラス及びアイソタイプを有する抗体をも包含する。本発明における抗体の「機能的断片」とは、前記で定義した抗体の一部分(部分断片)であって、抗体の抗原への作用を1つ以上保持するものを意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$ 、ジスルフィド結合 $FV$ 、一本鎖 $FV(scFV)$ 、およびこれらの重合体等が挙げられる(D. J. King., Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T. J. International Ltd)。

本発明で「ヒト抗体」とは、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体を意味する。

「アゴニスティック」とは、B 細胞、腫瘍細胞又は樹状細胞などの細胞表面上に発現する CD40 に、そのリガンドが結合することを促進する作用、あるいは、CD40 リガンドが CD40 発現細胞に与える影響の 1 つ以上を、CD40 を発現する細胞に与える作用を意味し、「アゴニスティック抗体」とは、そのようなアゴニスティック作用を有する抗体を意味する。

「アンタゴニスティック」とは、B 細胞、腫瘍細胞又は樹状細胞などの細胞表面上に発現する CD40 にそのリガンドが結合することを阻害する作用、あるいは、CD40 リガンドが CD40 発現細胞に与える影響の 1 つ以上を中和する作用を意味し、「アンタゴニスティック抗体」とはそのような作用を有する抗体を意味する。

本発明で言う「樹状細胞 (DC)」とは、樹状白血球とも呼ばれ、強力な抗原提示機能を有する細胞の一群を指す。用いる樹状細胞は、例えば骨髓、さい帯血又は末梢血中に含まれる CD34 陽性前駆細胞を培養することによって誘導される。あるいは、末梢血中の CD14 陽性単球を GM-CSF 及び IL-4 の存在下で培養することにより得られる。

「未熟な DC」(Immature DC) とは、CD14 陰性、CD1a 強陽性、CD83, CD86 陽性、MHC クラス II 陽性である DC を意味する。

「成熟 DC」とは、CD14 陰性、CD1a 陽性で CD83, CD86, MHC クラス II 強陽性となったものを意味する。

本発明で「DC を活性化する」とは、CD40 による刺激に応答して DC が起こす変化を意味し、例えば 未成熟 DC を成熟化させ、CD80, CD86, HLA-ClassII を高発現させる、さらには IL-12 の産生を増強する、あるいは T 細胞が共存する場合には、T 細胞に刺激を与え、増殖を促すことを意味する。

本発明で B 細胞、B 細胞株を活性化するとは、CD40 による刺激に応答して細胞が起こす変化を意味し、例えば DNA 合成を生じ、チミジン取り込みを促進し、CD95 の発現量を増加させることをいう。

## 2. 抗体の取得

本件発明の抗体を取得するためには、抗原として組換え体で生産・精製した可溶性ヒト CD40、又はヒト CD40 を発現する遺伝子組換えマウス細胞株をマウスに免疫することが好適である。免疫に使用するマウスはヒト抗体を産生するマウス (Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol197:722) であることが望ましい。組換え体で生産・精製した可溶性ヒト CD40 に結合するモノクローナル抗体を選別することで、B 細胞特異的に反応するクローンを選抜するよりも、B 細胞以外の細胞に発現する CD40 にも反応する抗体を得やすいと考えられる。免疫したマウスのリンパ節の細胞や脾細胞を使用し、モノクローナル抗体の製造において慣用されているケーラー及びミルシュタインらの方法 (Nature., 1975 Vol. 256:495) を用いてハイブリドーマの作製を行うことができる。

また、BIAcore 2000 (ピアコア社) などの表面プラズモン共鳴測定装置を用いて可溶性 CD40L の CD40 への結合を解析し、CD40L と競合しない抗体を選別する。また B リンパ腫の細胞増殖抑制を抗体単独で抑制する抗体を選別した。さらに抗体の選別を DC に作用するか否かを指標として行うことにより、CD40L と競合せず、樹状細胞又は B 細胞に働き、かつ CD40 発現癌細胞の増殖を抑制するという利点を備えた抗体を作製・選別しうる。

本発明の抗体は、取得されたハイブリドーマを培養することによって得られる。また、B 細胞やハイブリドーマ等の抗体産生細胞からヒトモノクローナル抗体又はその可変領域をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主 (例えば哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など) に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を調製することができる (P. J. Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, J. W. Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS)。さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウシ、ヤギ、ヒツジまたはブタを作製し、そのトランスジェニック動物のミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。ハイブリドーマをインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特



性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地又は既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

### 3. スクリーニング

アゴニスティック抗体の選抜には、ヒト B リンフォーマを用いた解析によって行い、CD95 発現を促進する抗体の選別が可能である。さらに純化した DC の培養液に抗体を添加し、成熟させる抗体を選ぶ。あるいは、未熟な DC 細胞を用いた混合リンパ球反応で T 細胞増殖活性を示す抗体を選ぶ。さらに成熟した DC に添加し IL-12 生産促進作用のある抗体を選ぶ。また、CD40 を発現する腫瘍細胞の増殖を抑制もしくは細胞死誘導活性を持つ抗体を選ぶ。CD40L との競合は BIACore のような表面プラズモン共鳴測定装置を用いて、可溶性 CD40 と可溶性 CD40 リガンドの結合を抗体が阻害するかどうかで判別できる。あるいは、B 細胞株に対する CD40 リガンドの作用を増強するかどうかで判別する。

アンタゴニスティック抗体の選抜には、ヒト B リンフォーマを用いた解析によって行い、さらに FLAG をタグとして有する可溶性 CD40L を抗 FLAG 抗体存在下で添加することで、可溶性 CD40L の、ヒト B リンフォーマ細胞上の CD40 への結合をより強力に阻害する抗体の選別が可能である。可溶性 CD40L の代りに、CD40L をコードする遺伝子の導入により、細胞表面に多くの CD40L を発現している組換え細胞を用いることも可能である。次いでヒト抗体を抗ヒト IgG 抗体で架橋することで、架橋によって B リンパ腫を活性化してしまうクローンを除外する。さらに純化し成熟させた DC 細胞を用いた混合リンパ球反応で T 細胞増殖抑制活性を示す抗体や、あるいは成熟した DC に CD40 リガンドを添加した場合に IL-12 生産抑制作用のある抗体を選ぶ。

以上のようにして得られた抗体は、少なくとも以下のいずれかの治療効果上有用と考えられる性質を有するものである。

#### (1) アゴニスティック抗体の場合

(a) 樹状細胞に作用し、LPS(リポポリサッカライド)及びIFN $\gamma$ の存在化でIL-12を生産させる。この場合のLPS濃度は10pg/mlから10ng/mlであり、IFN $\gamma$ の濃度は $10^{-4}$ Mから $10^{-2}$ Mである。1 $\mu$ g/ml以上の抗体濃度、好ましくは0.1 $\mu$ g/ml以上の抗体濃度において、公知のアゴニスティック抗CD40抗体であるG28-5抗体を対照とした試験よりもIL-12の生産量が多い。1x10<sup>6</sup>個/mlの濃度の樹状細胞に抗体濃度0.1 $\mu$ g/ml以上が添加された場合に100pg/ml以上のIL-12が生産され、あるいは1 $\mu$ g/ml以上が添加された場合に1000pg/ml以上の、好ましくは10000pg/ml以上のIL-12が生産される。(実施例9、実施例13を参照のこと)

(b) 樹状細胞に結合し、樹状細胞を成熟させる作用を有する。しかも、20 $\mu$ g/ml以下の濃度、好ましくは0.1~15 $\mu$ g/ml、さらに好ましくは5~15 $\mu$ g/mlの濃度で抗体を樹状細胞とともに培養すると、その成熟させる活性はG28-5抗体よりも高い結果が得られる。(実施例9を参照のこと)

(c) B細胞樹立細胞株に対して、CD95の発現を促進する活性がG28-5抗体よりも高い。この場合、10 $\mu$ g/ml以上、好ましくは1 $\mu$ g/ml以上、さらに好ましくは0.1 $\mu$ g/ml以上、より好ましくは0.01 $\mu$ g/ml以上、最も好ましくは0.001 $\mu$ g/mlを超える抗体濃度において、G28-5抗体を対照とした試験よりもCD95の発現を促進する活性がG28-5抗体よりも高い。CD95の発現を促進する活性について、抗体濃度10 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml、0.1 $\mu$ g/ml、0.01 $\mu$ g/mlにおいてG28-5抗体を対照とした試験の倍率は以下の通りである(表1)。

表 1

抗体濃度	倍 率
10 $\mu$ g/ml	約2倍、好ましくは約3倍、より好ましくは4.5倍、さらに好ましくは6倍
1 $\mu$ g/ml	約2倍、好ましくは約5倍、より好ましくは約6倍、さらに好ましくは7倍
0.1 $\mu$ g/ml	2倍、好ましくは6倍、より好ましくは約7倍
0.01 $\mu$ g/ml	2倍、好ましくは4倍、より好ましくは5倍、さらに好ましくは約6倍

CD95の発現が促進するということは、抗体がB細胞樹立細胞株を活性化したことを意味する。ここで、B細胞樹立細胞株としては、Ramos細胞、HS-Sulton細胞

が挙げられる。なお、Ramos 細胞はバーキットリンパ腫であり、ヒトの胚中心の B 細胞のモデル細胞である。HS-Sulton 細胞はバーキットリンパ腫である。(実施例 6、実施例 12 を参照のこと)

(d) B 細胞樹立細胞株 (Ramos 細胞又は HS-Sulton 細胞) に対して DNA 合成、チミジン取り込み、増殖を抑制する活性が G28-5 抗体よりも高い。この場合の抗体濃度は、少なくとも  $0.05 \mu\text{g/ml}$ 、好ましくは  $0.1 \sim 15 \mu\text{g/ml}$  である。(実施例 8 を参照のこと)

(e) B 細胞樹立細胞株に対して細胞死を誘導する。(実施例 16 を参照のこと)

(f) CD40 リガンドの CD40 に対する結合を阻害しない。「阻害しない」とは、CD40 に予め抗体が結合した状態であっても (つまり抗体が存在する場合であっても)、該抗体が存在しない場合と同程度に、CD40L が CD40 に結合できることを意味する。CD40 リガンドと CD40 はいずれかあるいは双方が膜発現型あるいは可溶性タンパクであっても良い。(実施例 11 を参照のこと)

上記性質を有する抗体は、例えば、ハイブリドーマ KM302-1 (FERM BP-7578)、ハイブリドーマ KM341-1-19 (FERM BP-7759) により産生される。

ハイブリドーマ KM341-1-19 により産生されるモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)および軽鎖(L鎖)可変領域の塩基配列およびアミノ酸配列が決定された(実施例 17)。本発明はハイブリドーマ KM341-1-19 の生産するモノクローナル抗体の少なくとも重鎖可変領域、もしくは重鎖全長をコードする DNA、ならびに軽鎖可変領域をコードする DNA を提供する。当該 DNA は実施例 17 において記載されたものの他、コドン縮重により同じアミノ酸配列をコードする他の DNA をも包含する。また、本発明は、実施例 17 において開示された少なくとも重鎖可変領域のアミノ酸配列、もしくは重鎖全長のアミノ酸配列と、軽鎖可変領域のアミノ酸配列によって規定されるモノクローナル抗体もしくはその機能的断片を提供する。

## (2) アンタゴニスティック抗体の場合

(g) CD40 に対するリガンドの作用を中和する。ここで、「リガンドの作用」とは、T 細胞又は他の細胞上に発現するリガンドの作用、及び CD40 に対する遊離のリガンドの作用のいずれをも意味する。(実施例 7、実施例 14 を参照のこと)

(h) B 細胞樹立細胞株上の CD40 に対するリガンドが CD40 発現細胞に与える影響の 1 つ以上を中和し、かつ、抗免疫グロブリン抗体による架橋によって前記 B 細胞樹立細胞株上の CD40 に対するアゴニスティックな作用を示さない。その作用は 5D12 よりも弱い。「CD40 発現細胞に与える影響」とは、発現細胞の活性化を意味し、B 細胞においてはチミジン取り込み、増殖を、B 細胞樹立細胞株においては CD95 の発現増強などを意味する。また、DC においては成熟化、CD86、HLA-DR 発現増強、共存する T 細胞のチミジン取り込み、増殖の促進、IL-12 や IL-10 の生産などを意味する。抗免疫グロブリン抗体による架橋は、培養液中に  $0.1 \mu\text{g/ml}$  以上の抗免疫グロブリン抗体を存在させることにより行われる。(実施例 7 を参照のこと)

(i) B 細胞樹立細胞株に対して、架橋した CD40L あるいは、細胞に発現させた CD40L が CD95 の発現を増加させる活性を緩和又は中和する。タグに対する抗体などで架橋し、作用が増強された CD40L に対しても、活性を緩和あるいは中和する。CD40 に対するリガンド（遊離のリガンド、特定の細胞に発現するリガンドの両者を含む）が、CD40 発現細胞に結合すると、細胞内でシグナル伝達を起こして、最終的に細胞表面上に CD95 (Fas) を発現する。従って、本発明のアンタゴニスティック抗体は、CD40 に結合することにより、上記シグナル伝達を阻害して CD95 の発現を中和する。この場合の抗体濃度は、 $1 \mu\text{g/ml}$  以上、好ましくは  $0.1 \mu\text{g/ml}$  以上である。(実施例 7、実施例 14 を参照のこと)

(j) DC 上の CD40 に対してアンタゴニスティックである。すなわち、CD40L が DC を活性化する活性を緩和又は中和する。DC が共存する T 細胞上のリガンドによって刺激されると、T 細胞を活性化し、チミジン取り込みなどを促進させる。異なった個体由来の DC と T 細胞とを共存させる混合リンパ球反応では、DC と T 細胞が相互作用を起こすことで、T 細胞の活性化が起こる。本発明のアンタゴニスティック抗体は、CD40 に結合することにより、上記相互作用を阻害し、結果としてチミジンの取り込みが抑制される。この場合の抗体濃度は、少なくとも  $0.001 \mu\text{g/ml}$  であり、好ましくは  $0.1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$  である。(実施例 10 を参照のこと)

上記アンタゴニスティック抗体は、例えば、ハイブリドーマ KM281-1-10 (FERM BP-7579)、KM281-2-10-1-2 (FERM BP-7580) (2001 年 5 月 9 日付、独立行政法人



産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6))、4D11 (FERM BP-7758) により産生される。

(3) 本発明の抗体は、当業者に周知である遺伝子工学的改変、すなわち抗体重鎖のサブクラスを規定する領域を他のサブクラスを規定する領域に置換することにより、異なるサブクラスのものに変換しうる (例えば、EP 314161 公報を参照のこと)。重鎖 (heavy chain) の可変領域を、そのまま他のサブクラスの定常領域 (constant region) につなげることができる。例えば、本件発明の抗体のサブクラスを IgG2 あるいは IgG4 に変換することにより、Fc レセプターに対する結合度を低下させることが可能である。具体的には、Kabat ら (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)) による、ヒト抗体重鎖、EU index 118 (Ala), 119 (Ser) 部位に NheI site (GCTAGC) を導入し、この制限酵素を使って消化することにより、アミノ酸を変えずに、他のサブクラスの IgG とつなぎかえることができる。さらに、定常領域のアミノ酸配列を人為的に改変すること、あるいはそのような配列を有する定常領域配列と本発明の抗体の可変領域とを結合することにより、Fc レセプターに対する結合度を低下させることや (Lund J., et al., J. Immunol. 1991 vol 147:2657-2662)、CDC 活性を増加または減少することも可能である (Tao M., et. Al., J. Exp. Med. 1991 vol 1025-1028, Idusogie E E., et. Al., J. Immunol. 2001 vol 166:2571-5)。また、ADCC や CDC などの作用を避けるために、予めサブクラスが IgG2 や IgG4 の抗体のみを選別することも可能である。また、本件発明の抗体に、放射性核種、細菌毒素、化学療法剤、プロドラッグなどを結合させることにより癌などの疾患の治療効果をさらに増強することも可能である。

#### 4. 医薬組成物

また、本発明の抗体の精製された製剤を含有する医薬組成物もまた、本発明の範囲内に含まれる。このような医薬組成物は、好ましくは、抗体に加えて、生理学的に許容され得る希釈剤またはキャリアを含んでおり、他の抗体または抗生物質のような他の薬剤との混合物であってもよい。適切なキャリアには、生理的食

塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、および緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。或いは、抗体は凍結乾燥（フリーズドライ）し、必要とされるときに上記のような緩衝水溶液を添加することにより再構成して使用してもよい。投与経路は、経口ルート、並びに静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内の注射または配薬を含む非経腸的ルートである。

この場合、本発明の抗体の有効量と適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得るキャリアとの組合せとして投与される有効量は、1回につき体重 1kg あたり 0.1mg ~100mg であり、2日から8週間間隔で投与される。

本発明の抗体を含む医薬組成物を使用する場合は、アゴニスティック抗体については、免疫賦活化剤（抗ウィルス剤、抗感染症剤）、抗腫瘍剤、自己免疫疾患治療剤であり、これらの疾患が複数併発してもよい。あるいは、ガン特異的ペプチドなどのワクチンとアジュバントとして併用することもできる。また、アンタゴニスティック抗体については、臓器移植時における免疫抑制剤（膵島移植や腎臓などの移植時における拒絶反応、GVHD の予防又は治療剤）として、あるいは自己免疫疾患（例えば、リウマチ、動脈硬化治療薬、多発性硬化症、全身性エリトマトーデス、特発性血小板減少症、クローン病など）治療剤、喘息などアレルギー治療剤、血液凝固第 VIII 因子阻害症候群の治療薬として有用であり、これらの疾患が複数併発してもよい。

CD40 が関与する疾患の治療手段として、抗 CD40 抗体を用いる場合、DC 細胞の機能を指標に、抗体を選択することにより、より良い治療効果をもたらす抗体が得られると期待できる。

アゴニスティック抗体では、より DC の活性化ができる抗体を選抜することにより、免疫増強の作用の強い抗体が得られることが期待される。さらに成熟 DC の IL-12 の生産促進を指標とすることで、CTL 誘導作用の強い抗体が得られる。CTL 誘導により、ウィルス感染細胞や腫瘍細胞を除去する効果の高い抗体が得られる。また、相乗効果が期待できることから CD40 に結合する抗体でありながら、CD40 リガンドの CD40 に対する結合は阻害しないような抗体が望ましい。癌治療を考えた場合、CD40 を発現する癌細胞に直接細胞死を誘導あるいは増殖を抑制し、かつ

DC 細胞を効率的に活性化する抗体があれば、相乗的な効果が期待され、CD40 を発現しない腫瘍にも使用可能な治療薬となると考えられる。この抗体はウィルス感染症の治療薬や抗腫瘍薬として有用と考えられる。

一方、CD40 に特異的に結合し、CD40L の結合を抑制し、なおかつ、CD40 を活性化しない抗体についても、B 細胞に対するリガンドの作用を抑制するのみならず、DC 細胞への作用を抑制できることが望まれる。しかし、今まで得られた、抗体は B 細胞に対する効果を指標にとられてきたことから、樹状細胞にも強い抑制作用を持つ抗体を取得し、医薬品として開発することには大きな意義がある。さらに上述のように抗 CD40 抗体は架橋によって、全く逆の作用が懸念されるため、架橋によっても CD40 を活性化しない抗体が必要とされる。これまでに報告されたヒト CD40 に対する、マウス等の非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体、およびマウスモノクローナル抗体の可変領域とヒト免疫グロブリンの定常領域からなるキメラ抗体や CDR グラフティングによるヒト型化抗体は、抗原性を持つことが懸念されるため、CD40 リガンドとの結合を阻害する抗体としてはヒト抗体が望ましい。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、KM302-1 抗体が、CD95 発現を促進する結果を示す図である。

図 2A は、アンタゴニスティック抗体が Ramos 細胞に対する CD40 リガンドの働きを中和することを示す図である。

図 2B は、アンタゴニスティック抗体が Ramos 細胞に対する CD40 リガンドの働きを中和することを示す図である。

図 3 は、KM281-1-10 抗体が Ramos 細胞に対する CD40 リガンドの働きを中和することを示す図である。

図 4 は、架橋された KM281-1-10 抗体が CD95 発現を促進しない結果を示す図である。

図 5 は、架橋された 5D12 抗体が、CD95 発現を促進する結果を示す図である。

図 6 は、KM302-1 抗体による腫瘍細胞に対する増殖抑制効果を示す図である。

図 7 は、KM302-1 抗体が、DC 細胞の成熟化を促進する結果を示す図である。

図 8 は、KM302-1 抗体が、DC 細胞に IL-12 生産を促進する結果を示す図である。

図 9 は、KM281-1-10 抗体による、DC に対する CD40 リガンドの働きを中和することを示す図である。

図 10 は、KM281-1-10 抗体による、DC に対する CD40 リガンドの働きを中和することを示す図である。

図 11 は、KM302-1 抗体による未成熟 DC-MLR を活性化することを示す図である。

図 12 は、KM341-1-19 抗体等が、Ramos 細胞の CD95 発現を促進する結果を示す図である。

図 13 は、KM341-1-19 抗体が、成熟 DC 細胞の IL-12 生産を促進する結果を示す図である。

図 14 は、KM341-1-19 抗体が、成熟 DC 細胞の IL-10 生産を促進する結果を示す図である。

図 15 は、4D11 抗体等が、Ramos 細胞に対する CD40 リガンドの働きを中和することを示す図である。

図 16 は、KM302-1 抗体が、ヒト腫瘍細胞移植マウスモデルにおいて抗腫瘍効果を示す図である。

図 17 は、KM341-1-19 抗体が、腫瘍細胞に対して増殖抑制効果を示す図である。

図 18 は、F4-465, 4D11, KM281-1-10 が抗原特異的 IgG の産生を抑制することを示す図である。

図 19 は、F4-465, 4D11, KM281-1-10 が抗原特異的 IgM の産生を抑制することを示す図である。

図 20 は、F4-465 が扁桃腺 B 細胞の増殖を抑制することを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に技術的範囲が限定されるものではない。

##### 〔実施例 1〕 抗原の作製

###### (1) 細胞

EL-4 細胞は、マウス由来の T 細胞樹立株であり、容易に入手することができる。



(ATCC No. :TIB-39)。Ramos B 細胞 (ATCC No. :CRL-1596) 並びにマウス抗 CD40 抗体産生ハイブリドーマ G28-5 (HB-9110) 及び 5D12 (HB-11339) は、ATCC から購入した。

## (2) 抗原の発現と精製

ヒト CD40cDNA (Genbank Accession Number: NM\_001250) を鋳型として、以下のプライマーを用いて、PCR により (95℃ 5 秒、55℃ 30 秒、72℃ 30 秒) ×20 サイクルの条件で細胞外領域を増幅した。

プライマー 1 : 5'-CCCAGATCTGTCCATCCAGAACCACCCACTGCATGCAGAG-3' (配列番号 1)

プライマー 2 : 5'-ACAAGATCTGGGCTCTACGTATCTCAGCCGATCCTGGGGAC-3' (配列番号 2)

増幅した cDNA は、pFastBac ベクター (Gibco BRL) の、メリチンシグナル配列の後、ヒト IgG1 由来 FC 又はマウス IgG2a 由来 FC 領域の前に挿入した。CD40 生産のため、組換えバキュロウィルスは、使用説明書にしたがって作成した。Tn5 細胞を組替えウィルスで感染させた後、4 日間培養した。上清は、0.22µm フィルターで処理した後、ProteinG sepharose (Amersham Pharmacia) を添加し、4℃ で静かに振盪した。一晩後、sepharose をカラムに移し、20 倍容量の PBS で洗浄した。ヒト CD40 FC 蛋白質は、20mM グリシン緩衝液 (pH3.0) により溶出した。CD40 を細胞表面に発現させるためのベクターは、Randolph J. Noelle から入手した (Inui, S et al., EJI, 20, 1747-1753, 1990)。全長 cDNA は XbaI により酵素切断し、pCDNA3 (INVITROGEN) に挿入した。ベクターを EL-4 細胞に導入し、0.5mg/ml の G418 (Gibco BRL) 存在下で培養することにより安定発現株を得た。CD40 の発現は、FITC-結合抗ヒト CD40 抗体 (Pharminen) を使い、FACS 解析により確認した。

## 〔実施例 2〕 免疫用マウスの作製

免疫に用いたマウスは、内因性 Ig 重鎖及び  $\kappa$  軽鎖破壊の両者についてホモ接合体の遺伝的背景を有しており、かつ、ヒト Ig 重鎖遺伝子座を含む 14 番染色体断片 (SC20) 及びヒト Ig  $\kappa$  鎖トランスジーン (KCo5) を同時に保持する。このマウスはヒト Ig 重鎖遺伝子座を持つ系統 A のマウスと、ヒト Ig  $\kappa$  鎖トランスジーンを

持つ系統 B のマウスとの交配により作製した。系統 A は、内因性 Ig 重鎖及び  $\kappa$  軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な 14 番染色体断片 (SC20) を保持するマウス系統であり、例えば富塚らの報告 (Tomizuka et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2000 Vol97:722) に記載されている。A 系統マウスを免疫することによって、以下に示すハイブリドーマ、F2-103, F5-77 を取得した。また、系統 B は内因性 Ig 重鎖及び  $\kappa$  軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、ヒト Ig  $\kappa$  鎖トランスジーン (KC05) を保持するマウス系統 (トランスジェニックマウス) であり、例えば Fishwild らの報告 (Nat Biotechnol., 1996 Vol14:845) に記載されている。

系統 A の雄マウスと系統 B の雌マウス、あるいは系統 A の雌マウスと系統 B の雄マウスの交配により得られた、血清中にヒト Ig 重鎖及び  $\kappa$  軽鎖が同時に検出される個体 (Ishida&Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering, Abstract 2000) を、以下の免疫実験に用いた。なお、前記ヒト抗体産生マウスは、契約を結ぶことによって、麒麟麦酒株式会社より入手可能である。前記マウスを免疫することによって、以下に示すハイブリドーマ、KM302-1, KM341-1-19, KM643-4-11, 2053, 2105, 3821, 3822, 285, 110, 115, KM281-1-10, KM281-2-10-1-2, KM283-5, KM292-1-24, KM225-2-56, KM341-6-9, 4D11, 5H10, 11E1, 5G3, 3811, 3411, 3417 を取得した。また、Kuroiwa らが報告しているヒト抗体 Lambda 鎖を保持するキメラマウス (Kuroiwa et. Al., Nat Biotechnol., 2000 vol 18:1086) も以下の免疫実験に用いた。このマウスからはハイブリドーマ F4-465 を取得した。

### 〔実施例 3〕 ヒト CD40 に対するヒトモノクローナル抗体の調製

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、単クローン抗体実験操作入門 (安東民衛ら著作、講談社発行 1991) に記載される一般的方法に従って調製した。免疫原としてのヒト CD40 は、実施例 1 で調製したヒト CD40 ヒト FC と CD40 発現 EL-4 細胞を用いた。被免疫動物は、実施例 2 で作製したヒト免疫グロブリンを産生するヒト抗体産生マウスを用いた。

ヒト抗体産生マウスに、CD40:hFc を 1 個体当たり 2 から 100  $\mu$ g/回で免疫した。抗原溶液は初回を除いて等量の不完全フロイントアジュバント (シグマ) と混合

し、皮下に数カ所に分けて注入した。約 10 日から 3 週間ごとに 3-4 回免疫を行った。初回は不完全フロイントアジュバント（シグマ）を用いた。マウスの尾から採血し、血清中の CD40 に対するヒト抗体  $\gamma$  および  $\kappa$  を、ELISA を用いて測定した。脾臓を摘出する 3-4 日前に尾静脈より、PBS に溶解した CD40:Fc を 20  $\mu$ g 注射し最終免疫した。

ヒト抗体産生マウスに、ヒト CD40 を発現するマウス EL-4 細胞を免疫した。EL-4 細胞 10<sup>8</sup> 個/ml で PBS に懸濁し、予め PBS でエマルジョン化した等量の RIBI アジュバントと緩やかに混合した。細胞は約 10 日から 3 週間ごとに 3-5 回免疫を行った。アジュバントを用いない場合は、8000rad で X 線照射し用いた。

免疫されたマウスから脾臓を外科的に取得し、回収した脾臓細胞をマウスミエローマ SP2/0 (ATCC No.: CRL1581) と 5 : 1 で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール 1500 (Boehringer Mannheim 社製) を用いて細胞融合させることにより多数のハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの選択は、10%のウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum, FCS) とヒポキサンチン (H)、アミノプテリン (A)、チミジン (T) を含有する HAT 含有 DMEM 培地 (Gibco BRL 社製) 中で培養することにより行った。さらに、HT 含有 DMEM 培地を用いて限界希釈法によりシングルクローンにした。培養は、96 ウェルマイクロタイタープレート (ベクトンディッキンソン社製) 中で行った。抗ヒト CD40 ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンの選択 (スクリーニング) は、実施例 4 で後述する酵素標識免疫吸着アッセイ (ELISA) および蛍光活性化セルソーター (FACS) により測定することにより行った。

ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの ELISA によるスクリーニングは、以下に述べる 3 種類の ELISA および FACS 解析により、ヒト免疫グロブリン  $\gamma$  鎖 (hIg $\gamma$ ) 及びヒト免疫グロブリン軽鎖  $\kappa$  を有し、かつヒト CD40 に特異的な反応性を有するヒトモノクローナル抗体を産生する多数のハイブリドーマを得た。なお、本実施例を含め以下のいずれの実施例中、並びに実施例における試験結果として示した表または図中においては、各々の本発明のヒト抗ヒト CD40 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンは記号を用いて命名した。また、当該記号の次に「抗体」を付したものは、それぞれのハイブリドーマにより産生さ

れる抗体、または当該ハイブリドーマから単離された抗体遺伝子（全長あるいは可変領域）を保持する宿主細胞により生産された組換え抗体を意味する。また文脈上明らかな範囲において、ハイブリドーマクローンの名称が抗体の名称をあらわす場合がある。

以下のハイブリドーマクローンはシングルクローンを表わす。

アゴニスティック抗体：

KM302-1、KM341-1-19、KM643-4-11、2053、2105、3821、3822、285、110、115、F1-102、F2-103、F5-77、F5-157

アンタゴニスティック抗体：

KM281-1-10、KM281-2-10-1-2、KM283-5、KM292-1-24、KM225-2-56、KM341-6-9、4D11、5H10、11E1、5G3、3811、3411、3417、F4-465

それらの内 3 つのハイブリドーマクローン KM 302-1、KM 281-1-10 および KM 281-2-10-1-2 を平成 13 年（2001 年）5 月 9 日付で、クローン KM341-1-19 および 4D11 を平成 13 年（2001 年）9 月 27 日付で、クローン 2105 を平成 14 年（2002 年）4 月 17 日付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）にブダペスト条約に基づき国際寄託した。F2-103、F5-77 および F5-157 の重鎖および軽鎖の可変領域を有するプラスミドを 2001 年 4 月 19 日付で、ハイブリドーマクローン F1-102 および F4-465 を 2001 年 4 月 24 日付で ATCC (American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia, USA) (アメリカ国立菌培養収集所、アメリカ合衆国 ヴァージニア州 20110-2209 マナサス 10801 ユニバーシティブルバード) にブダペスト条約に基づき国際寄託した（表 2）。



表 2

名称	受託番号
KM302-1	FERM BP-7578
KM281-1-10	FERM BP-7579
KM281-2-10-1-2	FERM BP-7580
KM341-1-19	FERM BP-7759
4D11	FERM BP-7758
2105	FERM BP-8024
F1-102	ATCC PTA-3337
F4-465	ATCC PTA-3338
F2-103 重鎖 (F2-103-H)	ATCC PTA-3302
F2-103 軽鎖 (F2-103-L)	ATCC PTA-3303
F5-77 重鎖 (F5-77-H)	ATCC PTA-3304
F5-77 軽鎖 (F5-77-L)	ATCC PTA-3305
F5-157 重鎖 (F5-157-H)	ATCC PTA-3306
F5-157 軽鎖 (F5-157-L)	ATCC PTA-3307

#### 〔実施例 4〕 ハイブリドーマのスクリーニング

##### ヒト免疫グロブリン $\gamma$ 鎖を有するモノクローナル抗体の検出

実施例 1 で作製したヒト CD40 マウス FC ( $1\mu\text{g/ml}$ )  $50\mu\text{l}$ /ウェルを、ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Maxisorp、Nunc 社製) の各ウェルに加え、 $4^{\circ}\text{C}$  でインキュベートし、ヒト CD40 マウス FC をマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬 (ブロックエース、大日本製薬) を加え室温でインキュベートしブロックした。各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清 ( $50\mu\text{l}$ ) を加え、反応させた後、各ウェルを、 $0.1\%$  Tween20 含有リン酸緩衝液 (PBS-T) で洗浄した。次いで、過酸化酵素で標識されたヤギ抗ヒト IgG ( $\gamma$ ) 抗体 (シグマ、A0170) を  $1\%$  FBS 含有 PBS-T で  $5,000$  倍に希釈した溶液 ( $50\mu\text{l}$ /ウェル) を、各ウェルに加え、インキュベートした。マイクロプレートを、PBS-T で 3 回洗浄後、発色基質液 (TMB、 $50\mu\text{l}$ /ウェル、住友ベークライト社製) を各ウェルに加え、室温下で 30 分間インキュベートした。各ウェルに、停止液 ( $50\mu\text{l}$ /ウェル) を加え、反応を止めた。波長  $450\text{nm}$  での吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。陽性 well の培養上清を FACS にて解析し、Ramos 細胞を染色する well を選び、その細胞を限界希釈法でクローニングし、1well について 1 ク

ローンの細胞を得た。ヒト CD40 マウス FC を用いた ELISA で hκ 陽性を確認した。その結果、20 個体のマウスから 173 クローンの抗ヒト CD40 抗体が取得できた。その一部を表 3 (アゴニスティック抗体) 及び表 4 (アンタゴニスティック抗体) に示す。アゴニスティック抗体のうち、少なくとも KM341-1-19 と 2105 は、CD 40 L が発現している細胞、CD 40 が発現している細胞および抗体を用いた競合試験でリガンドとの顕著な競合を示さなかった。

表 3 アゴニスティック抗体

ハイブリドーマ	抗原	サブクラス	DC	腫瘍細胞
KM302-1	CD40 マウス FC	IgG4	活性化	増殖抑制
KM341-1-19	ヒト CD40 発現 EL-4	IgG2	活性化	増殖抑制
KM643-4-11	CD40 マウス FC	IgG1	未実施	未実施
2053	CD40 マウス FC	IgG2	未実施	未実施
2105	CD40 マウス FC	IgG2	未実施	未実施
3821	ヒト CD40 発現 EL-4	IgG3	未実施	未実施
3822	ヒト CD40 発現 EL-4	IgG3	未実施	未実施
285	CD40 マウス FC	IgG1	未実施	未実施
110	CD40 マウス FC	IgG4	未実施	未実施
115	CD40 マウス FC	IgG4	未実施	未実施
F2-103	CD40 マウス FC	IgG1	未実施	未実施
F5-77	CD40 マウス FC	IgG1	未実施	未実施

表 4 アンタゴニスティック抗体

ハイブリドーマ	抗原	サブクラス	架 橋 の 影響	DC-MLR
KM281-1-10	CD40 マウス FC	IgG1	小	抑制
KM281-2-10-1-2	CD40 マウス FC	IgG1	小	未実施
KM283-5	CD40 マウス FC	IgG4	大	抑制せず
KM225-2-56	CD40 マウス FC	IgG4	大	未実施
KM292-1-24	CD40 マウス FC	IgG2	大	未実施
KM341-6-9	ヒト CD40 発現 EL-4	IgG1	大	未実施
4D11	CD40 マウス FC	IgG1	小	未実施
5H10	CD40 マウス FC	IgG1	小	未実施
11E1	CD40 マウス FC	IgG1	小	未実施
5G3	CD40 マウス FC	IgG2	大	未実施
3811	ヒト CD40 発現 EL-4	IgG1	大	未実施
3411	ヒト CD40 発現 EL-4	IgG2	大	未実施
3417	ヒト CD40 発現 EL-4	IgG2	大	未実施
F4-465	ヒト CD40 発現 EL-4	IgG1	未実施	未実施

ヒト免疫グロブリン軽鎖  $\kappa$  (Ig $\kappa$ ) を有するモノクローナル抗体の検出は、過酸化酵素で標識したヤギ抗ヒト Ig $\kappa$  抗体(1,000 倍希釈、50  $\mu$ l/ウェル、Southern Biotechnology 社製)を用いた他は、上述したヒト免疫グロブリン $\gamma$ 鎖の ELISA と同様に行った。

各モノクローナル抗体のサブクラス同定は、それぞれ過酸化酵素で標識したヒツジ抗ヒト IgG1 抗体、ヒツジ抗ヒト IgG2 抗体、ヒツジ抗ヒト IgG3 抗体又はヒツジ抗ヒト IgG4 抗体 (各 2,000 倍希釈、50  $\mu$ l/ウェル、The Binding Site 社製)を用いた他は、上述したヒト免疫グロブリン $\gamma$ 鎖の ELISA と同様に行った。

#### ヒト CD40 発現細胞に対する各モノクローナル抗体の反応試験

CD40 が発現していると報告されている Ramos 細胞株に対する各モノクローナル抗体の反応性の検討を FACS 解析で行った。

2x10<sup>6</sup>/ml の濃度で Ramos 細胞株を 0.1%NaN<sub>3</sub>、2%FCS 含有 PBS の染色バッファー (SB) に浮遊させた。細胞浮遊液 (100  $\mu$ l/ウェル) を 96-well 丸底プレート (ベクトンディッキンソン社製) に分注した。各々のハイブリドーマの培養上清 (50  $\mu$ l) を加え、氷温下 30 分間インキュベートした。陰性コントロールとしてヒト血清アルブミンに対するヒト IgG1 抗体を用い、ハイブリドーマ培養培地で 2  $\mu$ g/ml の濃度に調製し、50  $\mu$ l 添加後氷温下 15 分間インキュベートした。SB で洗浄した後、250 倍希釈した R-PE 蛍光標識抗ヒト抗体 (Southern Biotechnology 社製) 50  $\mu$ l を加え、氷温下 15 分間インキュベートした。SB で 2 回洗浄した後、300-500  $\mu$ l の FACS 緩衝液に懸濁し、FACS (FACSort、FACScan、ベクトンディッキンソン社製) で各細胞の蛍光強度を測定した。その結果、Ramos 細胞株に結合活性を有する抗体を選別した。

#### 〔実施例 5〕 各抗体の調製

モノクローナル抗体を含む培養上清の調製は以下の方法にて行った。

G28-5 抗体生産ハイブリドーマは ATCC より入手した (ATCC No. HB-9110)。抗 CD40 抗体産生ハイブリドーマをウシインシュリン (5  $\mu$ g/ml、Gibco BRL 社製)、ヒト

トランスフェリン (5  $\mu$ g/ml、Gibco BRL 社製)、エタノールアミン (0.01mM、シグマ社製)、亜セレン酸ナトリウム ( $2.5 \times 10^{-5}$  mM、シグマ社製) 含有 eRDF 培地 (極東製薬社製) に馴化した。スピナーフラスコにて培養し、ハイブリドーマの生細胞率が 90% になった時点で培養上清を回収した。回収した上清は、10  $\mu$ m と 0.2  $\mu$ m のフィルター (ゲルマンサイエンス社製) に供し、ハイブリドーマ等の雑排物を除去した。

上記培養上清からの抗 CD40 抗体の精製は以下の方法で行った。抗 CD40 抗体を含む培養上清を Hyper D Protein A カラム (日本ガイシ製) あるいはマウス IgG1 の精製には Protein G カラム (アマシャムファルマシアバイオテク) を用い、付属の説明書に従い吸着緩衝液として PBS (-)、溶出緩衝液として 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3) を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は 1 M Tris-HCl (pH 8.0) あるいは  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液を添加して pH 7.2 付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜 (10000 カット、Spectrum Laboratories 社製) あるいは SP カラム (アマシャムファルマシアバイオテク) を用いて PBS (-) に置換し、孔径 0.22  $\mu$ m のメンブランフィルター MILLEX-GV (MILLIPORE 製) でろ過滅菌した。精製抗体の濃度は 280 nm の吸光度を測定し、1 mg/ml を 1.45 OD として算出した。

#### 〔実施例 6〕 Ramos 細胞における抗 CD40 アゴニスティック抗体による CD95 発現促進

$5.0 \times 10^5$  個/ml の Ramos 細胞懸濁液を 96 ウエルプレートに 100  $\mu$ l/well で播種した (1 ウェルあたり  $5 \times 10^4$  個)。ハイブリドーマ培養上清又は精製抗体を 20  $\mu$ g/ml に培地で希釈し、96 ウエルプレートに 100  $\mu$ l/well の濃度で添加した。一晚培養後、細胞を集め R-PE 標識抗 CD95 抗体 (PharMingen NJ) を用い、FACSCan あるいは FACSort (ベクトンデッキンソン) を使って解析した。図 1 に結果を示す。図中横軸は CD95 の発現強度を示す。抗体添加を太線、未添加を細線により示した。KM302-1 抗体は、公知の抗体である G28-5 抗体に比して、CD95 発現をより促進することが示された。すなわち、より効果の高いアゴニスティックであることが示された。



〔実施例 7〕 Ramos 細胞における抗 CD40 アンタゴニスティック抗体による CD95 発現抑制

1.0x10<sup>6</sup>個/ml の Ramos 細胞懸濁液を 96 ウエルプレートに 50  $\mu$ l/well で播種した。ハイブリドーマ培養上清又は精製抗体を 2  $\mu$ g/ml に培地で調整し、96 ウエルプレートに 100  $\mu$ l/well 添加した。可溶性 CD40 リガンド (ALEXIS CORPORATION) を 4  $\mu$ g/ml と抗 FLAG 抗体 (M2、シグマ) 4  $\mu$ g/ml とを培地に添加し、96 ウエルプレートに 50  $\mu$ l/well 添加した。一晚培養後、細胞を集め R-PE 標識抗 CD95 抗体 (Pharmingen NJ) を用い、FACS を使って解析した。図 2A、図 2B、図 3 に結果を示す。図中横軸は CD95 の発現強度を示す。KM281-1-10、KM281-2-10-1-2、KM283-5、KM292-1-24、KM225-2-56 の各ハイブリドーマが生産した抗体では陰性コントロールと同程度まで CD95 の発現を抑制した。

図 3 において、KM281-1-10 抗体 (下パネル) は、公知の抗体である 5D12 抗体 (中央パネル) がわずかにしか CD95 発現を抑制しなかったのに比して、CD95 発現をより抑制することが示された。すなわち、より効果の高いアンタゴニスティックであることが示された。これによってヒトモノクローナル抗体がアンタゴニスティック抗体であることが示された。

抗免疫グロブリン抗体による架橋の影響

1.0x10<sup>6</sup>個/ml の Ramos 細胞懸濁液を 96 ウエルプレートに 50  $\mu$ l/well で播種した。ハイブリドーマ培養上清又は精製抗体を 2  $\mu$ g/ml に培地で調整し、96 ウエルプレートに 100  $\mu$ l/well 添加した。抗ヒト IgG 抗体 (シグマ、I3382) あるいは抗マウス IgG 抗体 (Biosource、AMI3401) を 4  $\mu$ g/ml となるよう培地に添加し、96 ウエルプレートに 50  $\mu$ l/well 添加した。一晚培養後、細胞を集め R-PE 標識抗 CD95 抗体 (Pharmingen NJ) を用い、FACS を使って解析した。図 4、図 5 に結果を示す。図中横軸は CD95 の発現強度を示す。KM281-1-10、KM281-2-10-1-2 の各ハイブリドーマが生産した抗体では CD95 の発現を抑制した。しかし、5D12、KM283-5、KM292-1-24、KM225-2-56 の各ハイブリドーマが生産した抗体では CD95 の発現を逆に増強した。

## 〔実施例 8〕 Ramos 細胞における抗 CD40 アゴニスティック抗体による増殖抑制

1.0x10<sup>5</sup> 個/ml の Ramos 細胞、HS-Sulton 懸濁液を 96 ウエルプレートに 100  $\mu$ l/well で播種した。精製抗体あるいは可溶性 CD40 リガンドと抗 FLAG 抗体 (M2) との等量混合物を培地に添加し、2 日培養後、100  $\mu$ Ci/ml の <sup>3</sup>H-Thymidine (Amersham Pharmacia) を 10  $\mu$ l 添加した。18 時間後、Macro96 Harvester (SKATRON) を用いて、Printed Filtermat A (Wallac) にハーベストし、乾燥後 Betap;Scint (Wallac) に良く浸し、パッケージング後、1205 BETAPLATE 液体シンチレーションカウンターで活性測定した。図 6 に結果を示す。図中、縦軸は細胞による <sup>3</sup>H チミジンの取り込み量を、横軸は培養液中の抗体あるいは CD40L 濃度を示す。Ramos 細胞、HS-Sulton 細胞ともに、KM302-1 抗体を添加した場合に、従来の G28-5 抗体や CD40L と比較して、チミジンの取り込みが低く、KM302-1 抗体が腫瘍細胞の増殖を効果的に抑えられるアゴニスティック抗体であることが示された。

## 〔実施例 9〕 CD40 アゴニスティック抗体による樹状細胞の活性化

## (1) 材料及び方法

組換え型ヒト IL-4 は Genzyme techne 社より購入した。抗ヒト CD14 MACS beads は Miltenyi Biotech GmbH 社より購入した。Lymphoprep は Nycomed Pharma AS より購入した。培養に用いた培地は、DC 誘導時には RPMI1640 (Gibco BRL) に 10% heat inactivated FCS (Cell Culture Technologies), 10mM HEPES (Sigma), 55  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Gibco BRL), 硫酸ストレプトマイシン (明治製菓) を加えて用いた。染色時の細胞洗浄には 2% FCS (Cell Culture Technologies), 0.02% Azaid 添加 PBS (Sigma) を用いた。細胞凍結時には日本全薬工業社製のセルバンカーを用いた。

## (2) 単球由来 DC の誘導

末梢血より Lymphoprep を用いた密度勾配遠心により単核球を調製した(PBMC)。これを抗ヒト CD14 MACS beads でポジティブセレクションすることにより CD14 陽性画分と陰性画分に分離した。陽性画分に組換え型ヒト GM-CSF (50ng/ml) と組

換え型ヒト IL-4 (100ng/ml) を添加して、10%FCS を添加した RPMI1640 培地にて 6 well プレートで培養した。培養開始時の細胞濃度は  $1 \times 10^6/\text{ml}$  で 1 well に 3ml ずつで行った。培養中は 2 日に 1 度の培地交換を行った。培地交換は培養液の 1 割を遠心チューブにとり遠心し、上清を除去後、とった培養液の 2 倍容量の新しい培養液 (サイトカインなどを上記濃度で含む) で懸濁し、各 well に戻した。培養 6 日目には細胞を回収し、細胞数を計算後、上記培地に  $1 \times 10^6/\text{ml}$  の濃度で懸濁し、抗 CD40 抗体又はそのアイソタイプ対照を添加して 24 well プレートでさらに 4 日間の培養を行った。この間培地交換は行わなかった (1 ウェルあたりの細胞数  $1 \times 10^6$  個、細胞濃度  $1 \times 10^6$  個/ml)。

### (3) 細胞染色及びフローサイトメーターによる解析

染色には抗 HLA-DR 抗体 (アイソタイプ対照: rat IgG2a)、抗 CD86 抗体 (アイソタイプ対照: ラット IgG1)、抗 CD83 抗体 (アイソタイプ対照: ラット IgG2b) を用いた。まず、抗体を加え 30 分、4℃ でインキュベートした後、3 回の洗浄し、Beckton Dickinson 社製 FACS Calibur を用いて解析を行った。

### (4) Mature DC に対する IL-12 secretion 能の亢進

上記のように未成熟 DC を得た後、LPS (400pg/ml) と IFN $\gamma$  ( $10^{-3}\text{M}$ ) を加えさらに 2 日間の培養後成熟 DC を得た。これに抗 CD40 抗体またはアイソタイプ対照を  $10 \mu\text{g/ml}$  加え、24 時間後の上清について IL-12 の産生を ELISA (Pharmingen 社製) 法にて測定した。

### (5) 結果および考察

アゴニスティック抗体である KM302-1 抗体が、DC の成熟化に及ぼす抗体の影響を図 7 に、成熟 DC の IL-12 生産に及ぼす影響を図 8 に示す。G28-5 抗体を対照として成熟の度合いを比べた。CD86、HLA-DR の発現を見た結果、G28-5 抗体と比較して、KM302-1 抗体ではさらに発現が上昇し、すなわち成熟度が亢進させることが示された。また、IL-12 の分泌については成熟 DC への KM302-1 抗体の処理によって亢進することが示された。以上より KM302-1 抗体が、DC に対するアゴニステ

ニック抗体として作用することが示された。

#### 〔実施例 10〕 DC-MLR

正常ヒトから採取した血液（末梢血）を、2000rpm 10 分遠心し、血清を吸い取った。血球分画を PBS で再懸濁し、Ficoll (Amersham Pharmacia) の上に静かに載せた。2000rpm 30 分遠心し、中間層の PBMC 部分を回収する。PBS で 2 回洗浄した後、MACS を用い特定の細胞分離に使用した。

DC 培養のための単球の分離は、MACS (Miltenyi Biotec GmbH) を用い添付の説明書にしたがって行った。簡単に説明すると、PBMC  $1 \times 10^8$  個に対して、MACS Buffer  $800 \mu\text{l}$ , MACS CD14 (Miltenyi Biotec GmbH, 502-01)  $200 \mu\text{l}$  を添加し、 $4^\circ\text{C}$  で 15 分処理した。MACS LS カラムに細胞を吸着させ、洗浄した。カラムに吸着した細胞を単球として回収した。カラムに吸着しなかった細胞に、MACS HLA-DR (Miltenyi Biotec GmbH, 461-01) を添加し、BS カラムで HLA-DR 陽性細胞を除去し、T 細胞画分とした。FACS により CD3 陽性細胞の比率を計測し、T 細胞画分全体の細胞数より実質的な T 細胞数を算出した。得られた単球は、6 ウェル培養皿に、 $1 \times 10^6$  細胞/ml の濃度で  $100 \text{ ng/ml}$  の IL-4 (R&D system),  $50 \text{ ng/ml}$  の G-CSF (KIRIN), 10% の FCS (SIGMA) を含む R0 培地 (PPMI 培地に、 $\beta$ -メルカプトエタノール (Gibco), HEPES (SIGMA) を添加したもの) で培養した。培養 5 日後に、 $10 \text{ ng/ml}$  の LPS (DIFCO) を添加し、成熟 DC に分化させた。

MLR は、異なるヒトから分離した、T 細胞と成熟 DC を混合することにより行った。T 細胞/DC の細胞比をそれぞれ、1:80 とし、T 細胞数は、 $2 \times 10^5$  細胞/ウェルとする。まず最初に、DC に抗体を加え 30 分間反応させる。その後、T 細胞を加え、4 日培養した後に、 $100 \mu\text{Ci/ml}$  の  $^3\text{H}$ -Thymidine (Amersham Pharmacia) を  $10 \mu\text{l}$  添加した。14 時間後、Macro96 Harvester (SKATRON) を用いて、Printed Filtermat A (Wallac) にハーベストし、乾燥後 Betap;Scint (Wallac) に良く浸し、パッケージング後、1205 BETAPLATE 液体シンチレーションカウンターで活性測定した。また未成熟 DC を用いた MLR は、異なるヒトから分離した、T 細胞と成熟 DC を混合することにより行った。T 細胞/DC の細胞比をそれぞれ、1:40 として同様に行った。図 9、図 10 に結果を示す。KM281-1-10 抗体の添加によりチミジンの



取り込みが低く、MLRが抑えられることが示された。また、図10においてKM283-5、5D12抗体はDC-MLRを抑制できず、すなわちKM281-1-10抗体のみがDCに対するCD40リガンドの働きを中和するアンタゴニスティック抗体であることが示された。さらに、アゴニスティック抗体であるKM302-1抗体が、未成熟DCを用いたMLRに及ぼす抗体の影響を調べた結果を図11に示す。DCが活性化することにより、T細胞との相互作用が促進され、チミジンの取り込みが増加している。これによりKM302-1は未成熟DCに作用するアゴニスティック抗体であることが示された。

〔実施例11〕 CD40抗体によるCD40LのCD40への結合に及ぼす影響

BIAcore 2000（ピアコア）を用いて、抗CD40抗体を、固定化されたCD40ヒトFCに結合させた後、可溶性CD40LのCD40への結合量の変化を測定した。装置に付属した説明書に従い、可溶性CD40ヒトFCをCMチップ（CM5, ピアコア）に固定化した。次いで25（ $\mu\text{g/ml}$ ）の抗CD40抗体を添加し、CD40に結合させた。さらに10（ $\mu\text{g/ml}$ ）の可溶性CD40Lを添加し結合させた。CD40L添加前後の結合量の差を測定した。コントロールIgGを添加した場合、CD40Lの結合量は100RUとなった。KM302-1抗体添加後では、CD40Lの結合量は110RUとなり、KM283-5抗体添加後では、18RUとなった。これにより、KM302-1抗体はCD40LのCD40への結合を阻害しないことが示された。

〔実施例12〕 Ramos細胞における抗CD40アゴニスティック抗体によるCD95発現促進

実施例4で得られたハイブリドーマの精製抗体を実施例6の方法に従って解析し、アゴニスト抗体を生産するクローンを選別した（1ウェルあたりの細胞数 $5 \times 10^4$ 個、細胞濃度 $2.5 \times 10^5$ 個/ $\text{ml}$ ）。図12に結果を示す。図中横軸は培養液中の抗体濃度を、縦軸は平均蛍光強度、すなわちCD95発現強度を示す。KM341-1-19, 2105抗体は、 $0.01 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で公知のマウス抗体であるG28-5抗体に比して、Ramos細胞に対してCD95発現をより促進することが示された。すなわち、より効果の高いアゴニスティックであることが示された。また、 $0.01 \mu\text{g/ml}$ でKM341-1-19, 2105抗体のRamos細胞にCD95発現を増進するアゴニスト活性は10

$\mu\text{g/ml}$  の G28-5 抗体の活性より高かった (図 12)。それぞれの抗体濃度において、CD95 の発現が G28-5 抗体を添加した場合の何倍に相当するかを表 5 にまとめた。

表 5

抗体濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	KM341-1-19	2105	F5-77	F2-103
0.01	5.7	3.9		
0.1	7.0	7.1	1.2	1.2
1	5.7	5.1	1.7	1.8
10	4.5	3.3	2.0	1.7

### 〔実施例 13〕 CD40 アゴニスティック抗体による樹状細胞の活性化

実施例 9 の方法に従って、CD40 アゴニスティック抗体による成熟 DC の IL-12 および IL-10 生産に及ぼす影響を調べた。IL-10 は ELISA (Pharmingen 社製) 法にて測定した。図 13 および図 14 に結果を示す。KM341-1-19 抗体の処理によって IL-12 の分泌が亢進することが示された。一方、5000rad で X 線照射した、CD40 リガンド発現組換え L 細胞を  $2 \times 10^5$  個/ml 共存させた場合でも、IL-12 と IL-10 の培養液中濃度は 254、51pg/ml であり、KM341-1-19 抗体を  $1 \mu\text{g/ml}$  添加した場合より少なかった。

以上より KM341-1-19 抗体が、DC に対して効果的なアゴニスティック抗体として作用することが示された。 $0.1 \mu\text{g/ml}$  で KM341-1-19 抗体の成熟 DC に IL-12 を分泌させるアゴニスト活性は  $100 \mu\text{g/ml}$  の G28-5 抗体の活性より高く、 $1 \mu\text{g/ml}$  で KM341-1-19 抗体の成熟 DC に IL-12 を分泌させるアゴニスト活性は  $100 \mu\text{g/ml}$  の G28-5 抗体の活性より 100 倍以上高かった (図 13)。また、 $1 \mu\text{g/ml}$  で KM341-1-19 抗体の成熟 DC に IL-10 を分泌させるアゴニスト活性は  $100 \mu\text{g/ml}$  の G28-5 抗体の活性より 10 倍以上高かった (図 14)。また、KM341-1-19 抗体は、サブクラスが IgG2 であり、IgG1 や IgG3 より Fc レセプターへの結合性が低く、NK 細胞のキラー活性の感作や補体系の活性化も弱い。このことから抗体によって、CD40 発現細胞の機能あるいは細胞そのものが減少してしまうという危険性が低いと考えられる。また Fc レセプターによる架橋を受けにくいことから、体内でのアゴニスト活性が、架橋によって大きく変動することがなく、薬効を制御し易いと期待される。

〔実施例 14〕 Ramos 細胞における抗 CD40 アンタゴニスティック抗体による CD95 発現抑制

1.0x10<sup>6</sup>個/ml の Ramos 細胞懸濁液を平底 96 ウェルプレートに 50  $\mu$ l/well で播種した (1 ウェルあたり細胞数 5x10<sup>4</sup> 個)。培地で希釈した精製抗体を 96 ウェルプレートに 100  $\mu$ l/well 添加した。ヒト CD40 リガンドを発現する組換えマウス L 細胞 (Spriggs, M. K. et. al., J. Exp. Med., 176: 1543, 1992; Garrone, P. et. al., J. Exp. Med., 182: 1265, 1995 など参照のこと) を 1.0x10<sup>5</sup> 個/ml に調製し、50  $\mu$ l/well で添加した (1 ウェルあたり Ramos 細胞の細胞数 5x10<sup>4</sup> 個、細胞濃度 2.5x10<sup>5</sup> 個/ml、1 ウェルあたりマウス L 細胞の細胞数 5x10<sup>3</sup> 個、細胞濃度 2.5x10<sup>4</sup> 個/ml)。一晚培養後、細胞を集め R-PE 標識抗 CD95 抗体を用い、FACS を用いて解析した。図 15 に結果を示す。図中縦軸は平均蛍光強度、すなわち CD95 の発現強度を示す。公知の抗体である 5D12 抗体がわずかにしか抑制しなかったのに比較して、4D11 抗体では 0.1  $\mu$ g/ml の濃度でも CD40L 発現細胞を添加しない陰性コントロールと同程度まで CD95 の発現を抑制した。また、1  $\mu$ g/ml の濃度では、4D11, F4-465, KM281-1-10 が CD40L 発現細胞を添加しない陰性コントロールと同程度まで CD95 の発現を抑制した。これによって 4D11, F4-465, KM281-1-10 抗体が、より効果的なアンタゴニスティック抗体であることが示された。それぞれの抗体濃度において、アンタゴニスティック抗体無添加の対照を 100 とした平均蛍光強度の相対値を表 6 に示す。

表 6

抗体濃度 ( $\mu$ g/ml)	5D12	4D11	F4-465	KM281-1-10
0.1	77.6	11.8	49.6	60.1
1	72.3	0.01	2.5	7.3
10	69.5	0	1.1	2.6

〔実施例 15〕 抗 CD40 アゴニスティック抗体による Ramos 細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果

生後 5 週齢の C. B. 17/Icr-scidJcl マウス (日本クレア) に抗アシアロ GM1 抗体

を静脈注射した。1 日後に腫瘍細胞として Ramos 細胞をマウス 1 匹当たり  $5 \times 10^6$  個静脈注射した。1 日後に KM302-1 抗体あるいは陰性対照として抗ヒトアルブミンヒト IgG 抗体を静脈注射した。投与量は KM302-1 抗体をマウス 1 匹当たり 1、10、100  $\mu\text{g}$ 、陰性対照抗体 100  $\mu\text{g}$  をそれぞれ 5 個体のマウスに 1 回投与した。結果を図 16 に示す。陰性対照投与群は移植 34 日後にすべて死亡したのに対して、KM302-1 抗体 10  $\mu\text{g}$ 、100  $\mu\text{g}$  を投与された群では 5 匹すべて生存しており、KM302-1 抗体の抗腫瘍効果が確認された。KM302-1 抗体は IgG4 サブクラスであり、Fc レセプターを介した抗体依存性細胞傷害機構 (ADCC) や補体系の活性化が弱いにもかかわらず、10  $\mu\text{g}$  単回投与で担ガンマウスの生存期間の延長が見られた。

#### 〔実施例 16〕 抗 CD40 アゴニスティック抗体による Ramos 細胞の増殖抑制

10%FBS 添加 RPMI1640 培地で  $1 \times 10^4$  個/ml に調製した Ramos 細胞懸濁液 100  $\mu\text{l}$  を 96 ウェルプレートに分注し、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に培地を用いて調製した KM341-1-19 抗体あるいは可溶性リガンド溶液を添加した。可溶性リガンドにはリガンドと同濃度 (反応溶液中の濃度が 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の抗 FLAG 抗体 (M2) を共存させ活性を強めた。5 日間培養後、各ウェルに 20  $\mu\text{l}$  の MTS 試薬 (Promega) を加え 2 から 3 時間反応させた。波長 490nm で細胞や抗体を含まない培地のみのウェルとの吸光度の差を測定し、生存している細胞数を測定した。また、同様に 96 ウェル U 底プレートを用いて G28-5 抗体と増殖抑制作用を比較した。2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に培地を用いて調製した KM341-1-19 抗体あるいは G28-5 抗体を添加した。結果を図 17 に示す。KM341-1-19 抗体を添加したウェルでは死細胞が観察され、細胞数は G28-5 抗体やリガンド添加のウェルに比較して顕著に少なく、吸光度も低くなり、腫瘍細胞の増殖が抑制され、細胞死が誘導されることが示された。

#### 〔実施例 17〕 抗体遺伝子の cDNA クローニング

KM341-1-19, 2105, 110, 115, KM281-1-10, 4D11, KM643-4-11, F4-465, F2-103, F5-77 抗体を生産するハイブリドーマを培養し、細胞を遠心によって集めた。これに TRIZOL (Gibco BRL) を添加し、取扱説明書にしたがって TotalRNA を抽出した。抗体 cDNA の可変領域のクローニングは、CLONTECH 社の SMART RACE cDNA



amplification Kit を用い、添付の説明書にしたがって行った。5  $\mu$ g の total RNA を鋳型として 1<sup>st</sup> Strand cDNA を作製した。KM341-1-19, 2105, 110, 115, KM281-1-10, 4D11, KM643-4-11, F2-103, F5-77 重鎖 (H 鎖) の増幅には、Takara 社の Z-Taq を用い、UMP と hh6 プライマーで、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 30 回繰り返した。さらに、この反応液 1  $\mu$ l を鋳型とし、NUMP と hh3 プライマーを用いて、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 20 回繰り返した。F4-465 重鎖の増幅には、UMP と hh2 プライマーを用い、Advantage 2 PCR kit (Clontech, cat#1910) を使って、94℃ 5 秒、72℃ 3 分 5 サイクル、94℃ 5 秒、70℃ 0 秒、72℃ 3 分、5 サイクル、94℃ 5 秒、68℃ 10 秒、72℃ 3 分、25 サイクルで行った。

hh6 プライマー : 5'-GGT CCG GGA GAT CAT GAG GGT GTC CTT-3' (配列番号 3 )

hh3 プライマー : 5'-GTG CAC GCC GCT GGT CAG GGC GCC TG-3' (配列番号 4 )

hh2 プライマー : 5'-GCT GGA GGG CAC GGT CAC CAC GCT G-3' (配列番号 5)

この後、増幅した PCR 産物を PCR purification kit (QIAGEN) により精製し、hh4 をプライマーとして塩基配列の決定を行った。あるいは、PCRScrip (Stratagene, La Jolla, CA) 又は PCR-Blunt (Invitrogene, Carlsbad, CA) にサブクローニングし配列を決定した。配列情報を基に、抗体重鎖特異的プライマーを合成した。KM341-1-19 の場合 341H プライマー、2105 の場合は 2105Hsal プライマー、110, 115 の場合には 110Hsal プライマー、KM281-1-10 の場合には 281Hsal プライマー、4D11 の場合は 4D11Sal プライマー、KM643-4-11 の場合には 643Hsal プライマー、F4-465 の場合は H11-9 5' プライマー、F2-103 の場合は F2-103H プライマー、F5-77 の場合は F5-77H プライマーを合成した。抗体重鎖特異的プライマーと hh4 を用いて、1<sup>st</sup> Strand cDNA から cDNA を増幅し、これを鋳型として抗体特異的プライマーを使って逆方向からの配列を決定した。

hh4 プライマー : 5'-GGTGCCAGGGGGAAGACCGATGG-3' (配列番号 6 )

341H プライマー : 5'-atatgtcgacGCTGAATTCTGGCTGACCAGGGCAG-3'  
(配列番号 7 )

2105Hsal : atatgtcgacTCCCAGGTGTTTCCATTCAGTGATCAG (配列番号  
8 )

110Hsal : atatgtcgacTTCCATTCGGTGATCAGCACTGAACAC (配列番号 9)

281Hsal : atatgtcgacTTTGAGAGTCCTGGACCTCCTGTG (配列番号 10)

4D11Sal : atatgtcgacGAGTCATGGATCTCATGTGCAAG (配列番号 11)

643Hsal : atatgtcgacCCAGGGCAGTCACCAGAGCTCCAGAC (配列番号 12)

H11-9 5' : -ACC GTG TCG ACT ACG CGG GAG TGA CT (配列番号 13)

F2-103H : accgtgtcgacgctgatcaggactgcaca (配列番号 14)

F5-77H : accgtgtcgacggtgatcaggactgaacag (配列番号 15)

KM341-1-19, 2105, 110, 115, KM281-1-10, 4D11, KM643-4-11, F2-103, F5-77 の軽鎖 (L 鎖) は、UMP と hk2 プライマーを使って、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 30 回繰り返して増幅した。F4-465 の軽鎖は、UMP と hL2 プライマーを使って、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 30 回繰り返して増幅した。増幅した PCR 産物を、PCR purification kit により精製し、hk6 もしくは hL2 プライマーを用いて塩基配列を決定した。この配列を基に、軽鎖特異的プライマーを合成した。KM341-1-19 の場合 341K プライマー、2105 の場合は 2053KBgl プライマー、110, 115 の場合には 110KBgl プライマー、KM281-1-10 の場合には 281KBgl プライマー、4D11 の場合は 4D11KBgl、KM643-4-11 の場合には 643KBgl プライマー、F4-465 の場合は Lamda 5' プライマー、F-103, F5-77 の場合は F2-103K プライマーを合成した。

341-1-19, 110, 115, KM643-4-11, KM281-1-10, 4D11, 2105 の場合は、軽鎖特異的プライマーと hk6 プライマーを使って 1<sup>st</sup> Strand cDNA から cDNA を増幅し、これを鋳型として両方向からの配列を決定した。F4-465, F2-103, F5-77 については、PCRScrip (Stratagene, La Jolla, CA) 又は PCR-Blunt (Invitrogene, Carlsbad, CA) にサブクローニングし配列を決定した。

hk2 プライマー : 5'-GTT GAA GCT CTT TGT GAC GGG CGA GC-3' (配列番号 16 )

hL2 プライマー : 5'- TCT TCT CCA CGG TGC TCC CTT CAT-3' (配列番号 17 )

341K プライマー : 5'-atatagatctGAACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGG-3' (配列番号 18)

2053KBgl : atatagatctCGCGGGGAAGGAGACTGCTCAGTT (配列番号 19)

110KBgl : atatagatctAGTCAGACCCAGTCAGGACACAGC (配列番号 20 )

281KBgl : atatagatctGAGCTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGG (配列番号 21 )

4D11KBgl : atatagatctTAAGCAAGTGTAACAACTCAGAGTAC (配列番号 22 )

643KBgl : atatagatctGAGGAACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGG (配列番号 23 )

Lamda 5' :-AACTCCAGATCTGCCTCAGGAAGCAGCATC (配列番号 24 )

F2-103K : aactccagatctagggcaagcagtggtaac (配列番号 25 )

hk6 プライマー : 5' -TGGCGGGAAGATGAAGACAGATGGTG-3' (配列番号 26 )

341-1-19 の H 鎖全長、及び L 鎖可変領域をコードする DNA 並びに H 鎖及び L 鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

H 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 27 の 5' 末端から 50 番目のアデニン (A) からはじまる ATG コドンであり、終止コドンは 1472 番目のチミン (T) からはじまる TGA である。抗体可変領域と定常領域の境界は 5' 末端から 493 番目のアデニン (A) と 494 番目のグアニン (G) 間に位置する。アミノ酸配列において、H 鎖可変領域は配列番号 28 の N 末端から 148 番目のセリン (S) 残基までであり、149 番目のアラニン (A) 以降が定常領域である。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、H 鎖のシグナル配列は配列番号 28 の N 末端より 20 番目のセリン (S) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 28 の 21 番目のグルタミン (Q) であるものと考えられる。

L 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 29 の 5' 末端から 29 番目の A からはじまる ATG コドンであり、可変領域は 5' 末端から 400 番目のアデニン (A) までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号 30 の N 末端から 124 番目のリジン (K) までである。精製された L 鎖蛋白質の N 末端分析により、L 鎖のシグナル配列は配列番号 30 の N 末端より 20 番目のグリシン (G) までであり、成熟体の N 末端は配列番号 30 の 21 番目のグルタミン酸 (E) であることが明らかとなった。

## 341-1-19 H鎖 (配列番号 27) :

GTCGACGCTGAATTCTGGCTGACCAGGGCAGCCACCAGAGCTCCAGACAATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTT  
CCTGCCCCGTGCTGGGCTCCCATGGGGTGTCTGTACAGGTCCAAGTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGT  
GAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTACTTG  
GAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGACCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTA  
TCGTGATTATGTAGGATCTGTGAAAAGTCGAATAATCATCAACCCAGACACATCCAACAACCAGTTCTCCCT  
GCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATATATTACTGTACAAGAGCACAGTGGCTGGGAGGGGA  
TTACCCCTACTACTACAGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAA  
GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT  
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACAC  
CTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTT  
CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCG  
CAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC  
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA  
AGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGA  
GGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA  
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT  
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA  
CAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCAGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA  
CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC  
GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGGATCC.

## 341-1-19 H鎖アミノ酸配列 (配列番号 28)

MSVSFLIFLPVLGLPWGVLQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRDLEWLGR  
TYYRSKWYRDYVGSVKSRIIINPDTSNNQFSLQLNSVTPEDTAIYYCTRAQWLGGDYPYYYSMDVWGQGTIV  
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
VTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE



KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

341-1-19 L鎖 (配列番号 29) :

ACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCT  
CCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGC  
CACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGC  
TCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTC  
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCG  
TAGCAACACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACG

341-1-19 L鎖アミノ酸配列 (配列番号 30)

MEAPAQLLFLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS  
NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNTFGPGTKVDIKRT

2105 の H鎖可変領域、及び L鎖可変領域をコードする DNA 並びに H鎖及び L鎖  
のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

H鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 31 の 5' 末端から 70 番目のアデニン (A)  
からはじまる ATG コドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は 5' 末端から  
495 番目のアデニン (A) と 496 番目のグアニン (G) 間に位置する。アミノ酸配  
列において、H鎖可変領域は配列番号 32 の N 末端から 142 番目のセリン (S) 残  
基までであり、149 番目のアラニン (A) 以降が定常領域である。遺伝子配列予測  
ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、H鎖のシグナル配列は配列番号 32 の N  
末端より 19 番目の cystein (C) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号  
32 の 20 番目の Glutamic acid (E) であるものと考えられる。

L鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 33 の 5' 末端から 28 番目の Aからはじまる  
ATG コドンであり、可変領域は 5' 末端から 405 番目のアデニン (A) までである。  
アミノ酸配列において、可変領域は配列番号 34 の N 末端から 126 番目のリジン

(K) までである。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、L 鎖のシグナル配列は配列番号 34 の N 末端より 20 番目の Glycine (G) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 34 の 21 番目の Glutamic acid (E) であるものと考えられる。

2105 H 鎖 (配列番号 : 31)

CTGAACACAGACCCGTCGACTCCCAGGTGTTTCCATTCAGTGATCAGCAC  
TGAACACAGAGGACTCACCATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTT  
TGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG  
GGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC  
TGGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGG  
GAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCTTGG  
TGCATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC  
AAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGC  
CTTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGCTATTTCTGGGGAGTTAGGTACTACGG  
TATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCA  
CCAAGG

2105 H 鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 32)

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDY  
AMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSLVHADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ  
MNSLRAEDTALYYCARDRLFGRVRYYGMDVWGQGTTVTVSSASTK

2105 L 鎖 (配列番号 : 33)

CTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCT  
CTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGAC  
ACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT  
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAG  
AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGC

CACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA  
CTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC  
AGCAGCGTAGCCACTGGCTCACTTTCGGCGGGGGGGACCAAGGTGGAGAT  
CAAACGTACGGTG

2105 L鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 34)

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL  
AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVY  
YCQQRSHWLTFGGGTKVEIKRTV

110 の H 鎖可変領域、及び L 鎖可変領域をコードする DNA 並びに H 鎖及び L 鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

H 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 35 の 5' 末端から 60 番目のアデニン (A) からはじまる ATG コドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は 5' 末端から 479 番目のアデニン (A) と 480 番目のグアニン (G) 間に位置する。アミノ酸配列において、H 鎖可変領域は配列番号 36 の N 末端から 140 番目のセリン (S) 残基までであり、141 番目のアラニン (A) 以降が定常領域である。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、H 鎖のシグナル配列は配列番号 36 の N 末端より 19 番目の Cystein (C) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 36 の 20 番目のグルタミン (Q) であるものと考えられる。

L 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 37 の 5' 末端から 35 番目の A からはじまる ATG コドンであり、可変領域は 5' 末端から 421 番目のアデニン (A) までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号 38 の N 末端から 129 番目のリジン (K) までである。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、L 鎖のシグナル配列は配列番号 38 の N 末端より 22 番目の Cystein (C) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 38 の 23 番目の valine (V) であるものと考えられる。

110 H 鎖 (配列番号 : 35)

CTGAACACAGACCCGTGCGACTTCCATTCGGTGATCAGCACTGAACACAGA  
GGACTCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTA  
AGAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGG  
TCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCC  
TTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT  
GGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTATTAAATACTATGCAGA  
CTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC  
TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTAC  
TGTGCGAGAGAGGGCTACAATATTTTGACTGGTTATTTTGGCTACTGGGGC  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGG

110 H鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 36)

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSY  
GMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAREGYNILTGYFGYWGQGTLVTVSSASTK

110 L鎖 (配列番号 : 37)

TCACAGATCTAGTCAGACCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCC  
CCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGT  
GTCATCTGGATGACCCAGTCTCCATCCTTACTCTCTGCATCTACAGGAGAC  
AGAGTCACCATCAGTTGTCGGATGAGTCAGGGCATTAGCAGTGATTAGC  
CTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTGAGCTCCTGATCTCTGCTG  
CATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCT  
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCTGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCA  
ACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTTTTCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGG  
ACCAAGGTGGAAATCAAACGTACG

110 L鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 38)

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCVIWM TQSPSLLSASTGDRV TISCRMSQGI



SSDLAWYQQKPGKAPELLISAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSE  
DFATYYCQQYYSPWTFGQGTKVEIKRT

115 の H 鎖可変領域、及び L 鎖可変領域をコードする DNA 並びに H 鎖及び L 鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

H 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 39 の 5' 末端から 60 番目のアデニン (A) からはじまる ATG コドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は 5' 末端から 479 番目のアデニン (A) と 480 番目のグアニン (G) 間に位置する。アミノ酸配列において、H 鎖可変領域は配列番号 40 の N 末端から 140 番目のセリン (S) 残基までであり、141 番目のアラニン (A) 以降が定常領域である。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、H 鎖のシグナル配列は配列番号 40 の N 末端より 19 番目の Cystein (C) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 40 の 20 番目のグルタミン (Q) であるものと考えられる。

L 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 41 の 5' 末端から 35 番目の A からはじまる ATG コドンであり、可変領域は 5' 末端から 421 番目のアデニン (A) までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号 42 の N 末端から 129 番目のリジン (K) までである。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、L 鎖のシグナル配列は配列番号 42 の N 末端より 22 番目の Cystein (C) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 42 の 23 番目の valine (V) であるものと考えられる。

#### 115 H 鎖 (配列番号 : 39)

CTGAACACAGACCCGTCGACTTCCATTCGGTGATCAGCACTGAACACAGA  
GGACTCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTA  
AGAGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGG  
TCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACC  
TTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT  
GGAGTGGGTGGCAGTTATATGGAATGATGGAAGTATTAAATACTATGCAGA  
CTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC

TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTAC  
TGTGCGAGAGAGGGCTACAATATTTTGA CTGGTTATTTTGGCTACTGGGGC  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGG

115 H鎖アミノ酸配列 (配列番号: 40)

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY  
GMHWVRQAPGKGLEWVAVIWN DGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAREGYNILTGYFGYWGQGTLVTVSSASTK

115 L鎖 (配列番号: 41)

TCACAGATCTAGTCAGACCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCC  
CCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGT  
GTCATCTGGATGACCCAGTCTCCATCCTTACTCTCTGCATCTACAGGAGAC  
AGAGTCACCATCAGTTGTCTGGATGAGTCAGGGGCATTAGCAGTGATTTAGC  
CTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTGAGCTCCTGATCTCTGCTG  
CATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGTGGCAGTGGATCT  
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCTGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCA  
ACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTTTTCCGTGGACGTT CGGCCAAGGG  
ACCAAGGTGGAAATCAAACGTACG

115 L鎖アミノ酸配列 (配列番号: 42)

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCVIWM TQSPSLLSASTGDRV TISCRMSQGI  
SSDLAWYQQKPGKAPELLISAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSE  
DFATYYCQQYYSPFWTFGQGTKVEIKRT

281-1-10 の H 鎖可変領域、及び L 鎖可変領域をコードする DNA 並びに H 鎖及  
び L 鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

H 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 43 の 5' 末端から 52 番目のアデニン (A)  
からはじまる ATG コドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は 5' 末端から

468 番目のアデニン (A) と 469 番目のグアニン (G) 間に位置する。アミノ酸配列において、H 鎖可変領域は配列番号 44 の N 末端から 139 番目のセリン (S) 残基までであり、140 番目のアラニン (A) 以降が定常領域である。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、H 鎖のシグナル配列は配列番号 44 の N 末端より 19 番目のセリン (S) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 44 の 20 番目のグルタミン (Q) であるものと考えられる。

L 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 45 の 5' 末端から 41 番目の A からはじまる ATG コドンであり、可変領域は 5' 末端から 424 番目のアデニン (A) までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号 46 の N 末端から 128 番目のリジン (K) までである。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、L 鎖のシグナル配列は配列番号 46 の N 末端より 20 番目の Glycine (G) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 46 の 21 番目の Glutamic acid (E) であるものと考えられる。

281-1-10 H 鎖 (配列番号 : 43)

CTGAACACAGACCCGTCGACTTTGAGAGTCCTGGACCTCCTGTGCAAGAA  
CATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGT  
CCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCT  
TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTGG  
TTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGG  
ATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAATCCCTCCCTCAAG  
AGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAA  
GCTGAATTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG  
CCCCCTTGACGGTGACTACAAATGGTTCCACCCCTGGGGCCAGGGAACC  
CTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGG

281-1-10 H 鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 44)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISGY  
YWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNS

VTAA DTAVYYCARAPLHG DYKWFHPWGQGLVTVSSASTK

281-1-10 L鎖 (配列番号: 45)

TCACAGATCTGAGCTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAACCC  
CAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGA  
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA  
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACT  
TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT  
GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTG  
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGAT  
TTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGATCACCTTCGGC  
CAAGGGACACGACTGGAGATCAAACGTACG

281-1-10 L鎖アミノ酸配列 (配列番号: 46)

METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSS  
YLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF  
AVYYCQQYGSSPITFGQGTRLEIKRT

4D11 の H 鎖可変領域、及び L 鎖可変領域をコードする DNA 並びに H 鎖及び L 鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

H 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 47 の 5' 末端から 16 番目のアデニン (A) からはじまる ATG コドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は 5' 末端から 456 番目のアデニン (A) と 457 番目のグアニン (G) 間に位置する。アミノ酸配列において、H 鎖可変領域は配列番号 48 の N 末端から 147 番目のセリン (S) 残基までであり、148 番目のアラニン (A) 以降が定常領域である。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、H 鎖のシグナル配列は配列番号 48 の N 末端より 26 番目のセリン (S) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 48 の 27 番目のグルタミン (Q) であるものと考えられる。

L 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 49 の 5' 末端から 59 番目の A からはじまる



ATG コドンであり、可変領域は 5' 末端から 442 番目のアデニン (A) までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号 50 の N 末端から 1 2 8 番目のリジン (K) までである。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、L 鎖のシグナル配列は配列番号 50 の N 末端より 22 番目の Cystein (C) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 50 の 21 番目の Alanine (A) であるものと考えられる。

4D11 H 鎖 (配列番号 : 47)

ATATGTCGACGAGTCATGGATCTCATGTGCAAGAAAATGAAGCACCTGTG  
GTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGCTGC  
AGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTACTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCC  
CTCACCTGCACCTGTCTCTGGCGGCTCCATCAGCAGTCCTGGTTACTACGG  
GGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGT  
ATCTATAAAAGTGGGAGCACCTACCACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGT  
CACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCT  
CTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTACGAGACCTGTAGTA  
CGATATTTTGGGTGGTTCGACCCCTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGT  
CTCCTCAGCTAGC

4D11 H 鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 48)

MDLMCKKMKHLWFFLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLLKPSSETLSLTCTV  
SGGSISSPGYYGGWIRQPPGKGLEWIGSIYKSGSTYHNPSLKSRTISVDTS  
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRPVVRVFGWFDPWGQGTLVTVSSAS

4D11 L 鎖 (配列番号 : 49)

AGATCTTAAGCAAGTGTAACAACCTCAGAGTACGCGGGGAGACCCACTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGT  
CCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTC  
TCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAG  
TGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAATTTGGA

AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA  
GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGT  
GGAAATCAAACGTACG

4D11 L鎖アミノ酸配列（配列番号：50）

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYD  
ASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPTFGQGTKVEIKRT

KM643-4-11 の H 鎖可変領域、及び L 鎖可変領域をコードする DNA 並びに H 鎖及び L 鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

H 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 51 の 5' 末端から 1 番目のアデニン (A) から始まる ATG コドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は 5' 末端から 447 番目のアデニン (A) と 448 番目のグアニン (G) 間に位置する。アミノ酸配列において、H 鎖可変領域は配列番号 52 の N 末端から 149 番目のセリン (S) 残基までであり、150 番目のアラニン (A) 以降が定常領域である。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、H 鎖のシグナル配列は配列番号 52 の N 末端より 20 番目のセリン (S) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 52 の 21 番目のグルタミン (Q) であるものと考えられる。

L 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 53 の 5' 末端から 38 番目の A から始まる ATG コドンであり、可変領域は 5' 末端から 409 番目のアデニン (A) までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号 54 の N 末端から 124 番目のリジン (K) までである。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、L 鎖のシグナル配列は配列番号 54 の N 末端より 20 番目の Glycine (G) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 54 の 21 番目の Glutamic acid (E) であるものと考えられる。

KM643-4-11 H鎖（配列番号：51）

ATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTTCCTGCCCCGTGCTGGGCCTCCCATGGGGT  
GTCCTGTCACAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCC

CTCGCAGACCCTCTCATTACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTA  
GCAACAGTGCTGCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTT  
GAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAAAGATTATGC  
AGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCA  
GTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACCCCCGAGGACACGGCTGTGTATT  
ACTGTGCAAGAGGGTATTACTATGGTTCGGGGAGCTATCCCTACTACTACC  
AAATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC

KM643-4-11 H鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 52)

MSVSFLIFLPVLGLPWGVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSFTCAISGDSVSSN  
SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYKDYAVSVKSRITINPDTSKNQFS  
LQLNSVTPEDTAVYYCARGYYYGSGSYPIYYQMDVWGQGTTVTVSSAS

KM643-4-11 L鎖 (配列番号 : 53)

AATTGAGGAACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAG  
CTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAA  
TTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGT  
GCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTG  
GTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATC  
CAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTT  
TATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGA  
GATCAAACGAAC

KM643-4-11 L鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 54)

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGESATLSCRASQSVSSYL  
AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAITGIPARFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVY  
YCQQRSENTEFGGGTKVEIKR

F4-465 の H 鎖可変領域、及び L 鎖可変領域をコードする DNA 並びに H 鎖及び L 鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

H 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 55 の 5' 末端から 47 番目のアデニン (A) からはじまる ATG コドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は 5' 末端から 484 番目のアデニン (A) と 445 番目のグアニン (G) 間に位置する。アミノ酸配列において、H 鎖可変領域は配列番号 56 の N 末端から 146 番目のセリン (S) 残基までであり、147 番目のアラニン (A) 以降が定常領域である。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、H 鎖のシグナル配列は配列番号 56 の N 末端より 19 番目のセリン (S) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 56 の 20 番目のグルタミン (Q) であるものと考えられる。

L 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 57 の 5' 末端から 81 番目の A からはじまる ATG コドンであり、可変領域は 5' 末端から 440 番目の (C) までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号 58 の N 末端から 120 番目の Threonine (T) までである。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、L 鎖のシグナル配列は配列番号 58 の N 末端より 19 番目の Alanine (G) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 58 の 20 番目の Serine (S) であるものと考えられる。

#### F4-465 H 鎖 (配列番号 : 55)

```
CTGAACACAGACCCGTCGACTACGCGGGAGACCACAGCTCCACACCATGGACTGGACCTGGAGGATCCTATT
CTTGGTGGCAGCAGCAACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCC
TGGGGCCTCAGTGAAGGTCCCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAGCTATGCTATGAATTGGGTGCG
ACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACACCAACACTGGGAACCCAACGTATGCCCA
GGGCTTCACAGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATCAGCAGCCT
AAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGTAGTACCAGTTGCTATGAGGGTAACTCACTA
CTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA
```

#### F4-465 H 鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 56)

```
MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGSELKKPGASVKVPCASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINT
NTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSYSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREVVPVAMRVTHYYGMDVWGQGTTVTV
```



## SSAST

## F4-465 L鎖 (配列番号 : 57)

CTGGGTACGGTAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCACAGATCTGCCTCAGGAAGCAGCATCGGAGGTG  
CCTCAGCCATGGCATGGATCCCTCTCTTCCTCGGCGTCCTTGTTTACTGCACAGGATCCGTGGCCTCCTATG  
AGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGGCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGTTCTGGAGATAAAT  
TGGGGGATAATTTTACTTGCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTTTCAGGATT  
GGAAGCGGCGCCCAGGGATCCCTGCGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCA  
GCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACATCAGCACTGTGGTATTCGGCG  
GAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCTCGCCCTCCTCTG  
AGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGAATTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGG  
CCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACA  
AGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGG  
TCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTTCATGAATTCAGATCCGTTAAC  
GGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCTGTGACCAACATA

## F4-465 L鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 58)

MAWIPLFLGVLVYCTGSVASYELTQPPSVSVAPGQTASITCSGDKLGDNFTCWYQQKPGQSPVLVIFQDWKR  
RPGIPARFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDISTVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL  
QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH  
EGSTVEKTVAPTECS

F2-103 の H 鎖可変領域、及び L 鎖可変領域をコードする DNA 並びに H 鎖及び L 鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

H 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 59 の 5' 末端から 32 番目のアデニン (A) からはじまる ATG コドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は 5' 末端から 463 番目のアデニン (A) と 464 番目のグアニン (G) 間に位置する。アミノ酸配列において、H 鎖可変領域は配列番号 60 の N 末端から 144 番目のセリン (S) 残基までであり、145 番目のアラニン (A) 以降が定常領域である。遺伝子配列予測

ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、H鎖のシグナル配列は配列番号 60 の N 末端より 19 番目の Cystein (C) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 60 の 20 番目の Glutamic acid (E) であるものと考えられる。

L鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 61 の 5' 末端から 29 番目の A からはじまる ATG コドンであり、可変領域は 5' 末端から 415 番目のアデニン (A) までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号 62 の N 末端から 1 29 番目のリジン (K) までである。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、L鎖のシグナル配列は配列番号 62 の N 末端より 22 番目の Cystein (C) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 62 の 23 番目の Asp (D) であるものと考えられる。

F2-103 H鎖 (配列番号 : 59)

GCTGATCAGGACTGCACACAGAGAACTCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTTGCTATTTT  
AAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAG  
ACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTACCTTCAGTACCTACTGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAA  
GGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTAGCACAACCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCG  
ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACAC  
GGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATAGAGTACTATGGATCGGGGAGTTATCCTACTACGGTATGGACGTCTG  
GGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTC  
CTCCAAGAGCACCTCT

F2-103 H鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 60)

MEFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAVSGFTFSTYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINS  
DGSSTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLWIGELSYGMDVWGQGTTVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTS

F2-103 L鎖 (配列番号 : 61)

GGGGAGTCAGACCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCT  
CTGGCTCCAGGTGCCAAATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA

CAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAACTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGG  
 GAAAGCCCCTAAGCTCCTGCTCTATAAGGCATCTGGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAG  
 TGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCA  
 ACAGTCTAATAGTTATTCGTGGACGTTCCGGCCACGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACC  
 ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA  
 TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA  
 GAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGA  
 CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA

F2-103 L鎖アミノ酸配列 (配列番号: 62)

MDMRVPAQLLGLLLWLPGAKCDIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSI SNWLAWYQQKPGKAPKLLLYK  
 ASGLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTINSLQPDDFATYYCQQSNSYSWTFGHGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYAC  
 EVTHQGL

F5-77 の H 鎖可変領域、及び L 鎖可変領域をコードする DNA 並びに H 鎖及び L 鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

H 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 63 の 5' 末端から 100 番目のアデニン (A) からはじまる ATG コドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は 5' 末端から 528 番目のアデニン (A) と 529 番目のグアニン (G) 間に位置する。アミノ酸配列において、H 鎖可変領域は配列番号 64 の N 末端から 143 番目のセリン (S) 残基までであり、144 番目のアラニン (A) 以降が定常領域である。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、H 鎖のシグナル配列は配列番号 64 の N 末端より 19 番目の Cystein (C) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 64 の 20 番目の Glutamic acid (E) であるものと考えられる。

L 鎖 DNA の翻訳開始点は、配列番号 65 の 5' 末端から 59 番目の A からはじまる ATG コドンであり、可変領域は 5' 末端から 445 番目のアデニン (A) までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号 66 の N 末端から 129 番目のリジン (K) までである。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) により、L 鎖

のシグナル配列は配列番号 66 の N 末端より 22 番目の Cystein (C) までと予測された。成熟体の N 末端は配列番号 66 の 23 番目の Asp (D) であるものと考えられる。

F5-77 H 鎖 (配列番号 : 63)

GGTCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCCTCACATTCAGTGATCAGCACTGAACACAGACCCGTCGACGGTG  
ATCAGGACTGAACAGAGAGAACTCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAA  
GGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG  
CTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC  
ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC  
GTATATTACTGTCCGAAAGATGGGGGGTACTATGGTTCGGGGAGTTATGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAG  
GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG  
AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC

F5-77 H 鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 64)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISG  
SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGGYYGSGSYGYFDYWGQGLVTVSSA  
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP

F5-77 L 鎖 (配列番号 : 65)

CAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGGGGGAGTCAGACCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGT  
CCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTC  
TCCATCTTCCGTGTCTGGATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAG  
CTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGGATCCAGTTTGCA  
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGATTTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA  
GCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAGCAGTTTCCCTCGGACATTGGCCAAGGGACCAA  
GGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC  
TGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGA



TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCT  
CAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA  
GGGCCTGA

F5-77 L鎖アミノ酸配列 (配列番号 : 66)

MDMRVPAQLLGLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSGSVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYA  
GSSLQSGVPSRFSGSGFGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQASSFPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC  
EVTHQGL

〔実施例 18〕 抗体たんぱく質の動物細胞における発現

前記で取得した抗体の可変領域を含む DNA 断片を N5KG1 (IDEC Pharmaceuticals, US patent 6001358) などの適当なベクターに組み込むことにより、抗体発現ベクターを作製する。発現のための宿主細胞には、例えば CHO-Ras (Katakura Y., et al., Cytotechnology, 31: 103-109, 1999) が好適に用いられる。宿主細胞へのベクターの導入は例えばエレクトロポレーションにより実施できる。抗体発現ベクター約 2  $\mu$ g を制限酵素で線状化し、Bio-Rad electrophoreter をもちいて 350V、500  $\mu$ F の条件で、 $4 \times 10^7$  個の CHO-Ras 細胞に遺伝子を導入し、96well culture plate に播種する。発現ベクターの選択マーカーに対応した薬剤を添加して培養を継続する。コロニーが観察されたら、実施例 4 に示した方法によって、抗体発現株を選別する。選別した細胞からの抗体精製は、実施例 5 にしたがって行うことができる。

〔実施例 19〕 CD40 アンタゴニスティック抗体による抗原特異的抗体産生抑制作用

マウス内因性 CD40 破壊についてホモ接合体の遺伝子背景を有し、かつ、ヒト CD40 遺伝子のトランスジーンを有しているマウス (Yasui, et al. Int. Immunol. 2002 Vol14 : 319) に 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl-chicken  $\gamma$ -globulin conjugates (NP-CGG: 大阪大学微生物病研究所 菊谷 仁教授より分与) とアラム (ARAM: Antigen recognition activation motif) の複合体を 100  $\mu$ g (NP-CGG 量と

して) 腹腔内注射することにより感作した。各モノクローナル抗体は抗原感作直前に 30 または 100  $\mu$ g の量を尾静脈内投与した。陰性対照として抗ヒトアルブミンヒト IgG4 抗体 100  $\mu$ g を投与した。感作 7 日後、眼窩静脈叢より採血し、血清中の NP 特異的 IgG1 および IgM 抗体量を ELISA 法により測定した。ELISA 法は NP を結合した牛血清アルブミン (NP-BSA : 2.5  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l/ウェルを、ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Maxisorp、Nunc 社製) の各ウェルに加え、4℃でインキュベートし、NP-BSA を吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬 (スーパーブロック、Pierce 社製) を加え室温でインキュベートしブロックした後、各ウェルを 0.1%Tween20 含有リン酸緩衝液 (PBS-T) で 3 回洗浄した。次いで、各ウェルに 10%ブロックエース含有 PBS-T で希釈した各血清 (50  $\mu$ l/ウェル) を加え、37℃で 2 時間インキュベートし反応させた。マイクロプレートを PBS-T で 3 回洗浄後、アルカリフォスファターゼで標識されたヤギ抗マウス IgG1 または IgM 抗体 (コスモバイオ、1070-04 または 1020-04) を 10%ブロックエース含有 PBS-T で 1,000 倍に希釈した溶液 (50  $\mu$ l/ウェル) を、各ウェルに加え、37℃で 2 時間インキュベートした。次いで、マイクロプレートを PBS-T で 3 回洗浄後、発色基質液 (50  $\mu$ l/ウェル、Sigma104、phosphatase substrate) を各ウェルに加え、波長 405nm での吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。その結果を図 18、図 19 に示す。図中縦軸は NP-CGG を C57BL/6 マウスに 2 回注射した後採血してプールした血清について、IgG1 抗体の場合は 10,000 倍希釈したものを、IgM 抗体の場合は 100 倍したものをそれぞれ 1 ユニットとして換算した値を示す。F4-465、4D11 および KM281-1-10 抗体は 100  $\mu$ g の投与により NP 特異的な IgG1 および IgM 抗体産生を強く抑制した。

〔実施例 20〕 CD40 アンタゴニスティック抗体による扁桃腺 B 細胞の増殖抑制  
ヒト扁桃腺はチルドレンズ・ホスピタル (サン ディエゴ、米国カリフォルニア州) より入手した。扁桃腺を小片に裁断し、細かく刻み、70 マイクロメートルのナイロンメッシュ細胞ストレーナーを通すことにより、細胞懸濁液を調製した。PBS にて数回洗浄の後、細胞数を計数し、90%ヒト血清 (ICN)、10%DMSO で凍結保存した。細胞は融解の後、10%ヒト血清、2.5 マイクログラム/ml

のアンフォテリシン（ファンギゾン、ギブコ／BRL）を添加した標準的RPMI培地に再懸濁して使用した。

$1 \times 10^5$ 個の細胞を96穴ウェルに加え、抗ヒトCD40抗体を0.01、0.1、1.0および10マイクログラム／mlの濃度で添加した。試験は各濃度につき三連で実施した。flag標識したCD40L（Alexis）1マイクログラム／ml、CD40Lエンハンサー抗体（Alexis）1マイクログラム／mlを各ウェルに添加して3日間培養の後、1マイクロCiの $[^3\text{H}]$ チミジンを各ウェルに添加した。12～15時間後に細胞を回収、液体シンチレーションカウンターにより扁桃腺B細胞の増殖を計測した。B細胞がCD40Lの刺激により増殖し、抗体を添加されなかった場合のカウントを100、CD40Lが添加されず、B細胞が刺激されなかった場合のカウントを0とした。例えば相対的なカウントの値として30が計測された場合、本実験では、70%の増殖阻害が起こったと表現することとした。

公知のアンタゴニスティック抗体である5D12は、抗体濃度100マイクログラム／mlでも50%を超える増殖抑制を示さなかった。

F4-465はわずか0.01マイクログラム／mlの濃度で約80%の増殖抑制を示し、0.1～10マイクログラム／mlの濃度で約95%の増殖抑制を示した（図20）。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、そのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、CD40に対する抗体が提供される。本発明の抗体は、CD40に対してアゴニスティックに作用するもの及びアンタゴニスティックに作用するものの両者が含まれるため、それぞれ、免疫賦活剤、免疫抑制剤等として有用である。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号1：合成DNA

配列番号 2 : 合成 DNA

配列番号 3 : 合成 DNA

配列番号 4 : 合成 DNA

配列番号 5 : 合成 DNA

配列番号 6 : 合成 DNA

配列番号 7 : 合成 DNA

配列番号 8 : 合成 DNA

配列番号 9 : 合成 DNA

配列番号 10 : 合成 DNA

配列番号 11 : 合成 DNA

配列番号 12 : 合成 DNA

配列番号 13 : 合成 DNA

配列番号 14 : 合成 DNA

配列番号 15 : 合成 DNA

配列番号 16 : 合成 DNA

配列番号 17 : 合成 DNA

配列番号 18 : 合成 DNA

配列番号 19 : 合成 DNA

配列番号 20 : 合成 DNA

配列番号 21 : 合成 DNA

配列番号 22 : 合成 DNA

配列番号 23 : 合成 DNA

配列番号 24 : 合成 DNA

配列番号 25 : 合成 DNA

配列番号 26 : 合成 DNA



## 請 求 の 範 囲

1. 以下の (a) ~ (f) から選ばれる少なくとも 1 つの性質を有する、ヒト CD40 に対する抗体又はその機能的断片。

(a) 樹状細胞に作用し、LPS 及び IFN $\gamma$  の存在下で IL-12 を生産させる

(b) 樹状細胞に作用し、該樹状細胞を成熟させる活性が G28-5 抗体よりも高い

(c) B 細胞樹立細胞株に対して、CD95 の発現を促進する活性が G28-5 抗体よりも高い

(d) B 細胞樹立細胞株に対して増殖を抑制する活性が G28-5 抗体よりも高い

(e) B 細胞樹立細胞株に対して細胞死を誘導する

(f) CD40 リガンドの CD40 に対する結合を阻害しない

2. 樹状細胞の成熟が、20  $\mu$ g/ml 以下の抗体濃度で行われるものである請求項 1 記載の抗体又はその機能的断片。

3. B 細胞樹立細胞株に対して CD95 の発現の促進が、20  $\mu$ g/ml 以下の抗体濃度で行われるものである請求項 1 記載の抗体又はその機能的断片。

4. B 細胞樹立細胞株が Ramos 又は HS-Sulton である請求項 1 記載の抗体又はその機能的断片。

5.  $1 \times 10^6$  個/ml の濃度の樹状細胞に、0.1  $\mu$ g/ml 以上の濃度の抗体が添加された場合に、100pg/ml 以上の IL-12 の生産をもたらすものである、請求項 1 記載の抗体又はその機能的断片。

6.  $1 \times 10^6$  個/ml の濃度の樹状細胞に、1  $\mu$ g/ml 以上の濃度の抗体が添加された場合に、1000pg/ml 以上の IL-12 の生産をもたらすものである、請求項 1 記載の抗体又はその機能的断片。

7.  $1 \times 10^6$  個/ml の濃度の樹状細胞に、1  $\mu$ g/ml 以上の濃度の抗体が添加された場合に、10000pg/ml 以上の IL-12 の生産をもたらすものである、請求項 1 記載の抗体又はその機能的断片。

8. B 細胞樹立細胞株 (Ramos 細胞) に対する CD95 の発現促進が、抗体濃度 0.01  $\mu$ g/ml から 10  $\mu$ g/ml の範囲において、対照である G28-5 抗体の約 2 倍から 3 倍以上である、請求項 1 記載の抗体又はその機能的断片。

15. 配列番号28および30にそれぞれ示される、ハイブリドーマ KM341-1-19 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号32および34にそれぞれ示される、ハイブリドーマ 2105 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号36および38にそれぞれ示される、ハイブリドーマ 110 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号40お

よび42にそれぞれ示される、ハイブリドーマ115の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号52および54にそれぞれ示される、ハイブリドーマKM643-4-11の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号60および62にそれぞれ示される、ハイブリドーマF2-103の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、または配列番号64および66にそれぞれ示される、ハイブリドーマF5-77の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の、マチュア部分のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片。

16. 配列番号27および29にそれぞれ示される、ハイブリドーマKM341-1-19から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号31および33にそれぞれ示される、ハイブリドーマ2105から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号35および37にそれぞれ示される、ハイブリドーマ110から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号39および41にそれぞれ示される、ハイブリドーマ115から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号51および53にそれぞれ示される、ハイブリドーマKM643-4-11から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号59および61にそれぞれ示される、ハイブリドーマF2-103から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、または配列番号63および65にそれぞれ示される、ハイブリドーマF5-77から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域の、マチュア部分のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片。

17. 以下の(g)～(j)から選ばれる少なくとも1つの性質を有する、ヒトCD40に対する抗体又はその機能的断片。

(g) CD40に対するリガンドの作用を中和する

(h) B細胞樹立細胞株上のCD40に対するリガンドがCD40発現細胞に与える影響の1つ以上を中和又は緩和し、かつ、抗免疫グロブリン抗体による架橋によって前記B細胞樹立細胞株上のCD40に対するアゴニスティックな作用が5D12より弱い

(i) B細胞樹立細胞株に対して、CD40リガンドが、CD95の発現を増加させる作

用を緩和又は中和する

(j) 樹状細胞に発現する CD40 に対してアンタゴニスティックな作用を有する

18. 飽和量の CD40L 発現細胞を添加した  $1 \times 10^6$  個/ml の濃度の Ramos 細胞に、 $0.1 \mu\text{g/ml}$  の濃度の抗体が添加された場合に、Ramos 細胞の CD95 の発現を対照の約 10% 以下に抑制しうるものである、請求項 17 記載の抗体又はその機能的断片。

19. 飽和量の CD40L 発現細胞を添加した  $1 \times 10^6$  個/ml の濃度の Ramos 細胞に、 $1 \mu\text{g/ml}$  の濃度の抗体が添加された場合に、Ramos 細胞の CD95 の発現が陰性コントロールと同レベルまで抑制されるものである、請求項 17 記載の抗体又はその機能的断片。

20. 飽和量の CD40L 発現細胞を添加した  $1 \times 10^6$  個/ml の濃度の Ramos 細胞に、 $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度の抗体が添加された場合に、Ramos 細胞の CD95 の発現が陰性コントロールと同レベルまで抑制されるものである、請求項 17 記載の抗体又はその機能的断片。

21. インビトロにおいて、可溶性 CD40L ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) を添加した  $1 \times 10^5$  個の扁桃腺 B 細胞に、 $0.001 \mu\text{g/ml}$  から  $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度の抗体が添加された場合に、扁桃腺 B 細胞の増殖が約 80 から 95% 以上抑制されるものである、請求項 17 記載の抗体又はその機能的断片。

22. インビトロにおいて、可溶性 CD40L ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) を添加した  $1 \times 10^5$  個の扁桃腺 B 細胞に、 $0.01 \mu\text{g/ml}$  から  $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度の抗体が添加された場合に、扁桃腺 B 細胞の増殖が約 95% 以上抑制されるものである、請求項 17 記載の抗体又はその機能的断片。

23. インビトロにおいて、可溶性 CD40L ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) を添加した  $1 \times 10^5$  個の扁桃腺 B 細胞に、 $0.001 \mu\text{g/ml}$  の濃度の抗体が添加された場合に、扁桃腺 B 細胞の増殖が約 80% 以上抑制されるものである、請求項 17 記載の抗体又はその機能的断片。

24. ハイブリドーマ KM281-1-10 (受託番号 FERM BP-7579)、4D11 (受託番号 FERM BP-7758) または F4-465 (受託番号 ATCC PTA-3338) により生産される抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片。



25. 配列番号 44 および 46 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ KM281-1-10 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 48 および 50 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ 4D11 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、または配列番号 56 および 58 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ F4-465 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の、マチュア部分のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片。

26. 配列番号 43 および 45 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ KM281-1-10 から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域、配列番号 47 および 49 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ 4D11 の産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、または配列番号 55 および 57 にそれぞれ示される、ハイブリドーマ F4-465 から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域の、マチュア部分のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片。

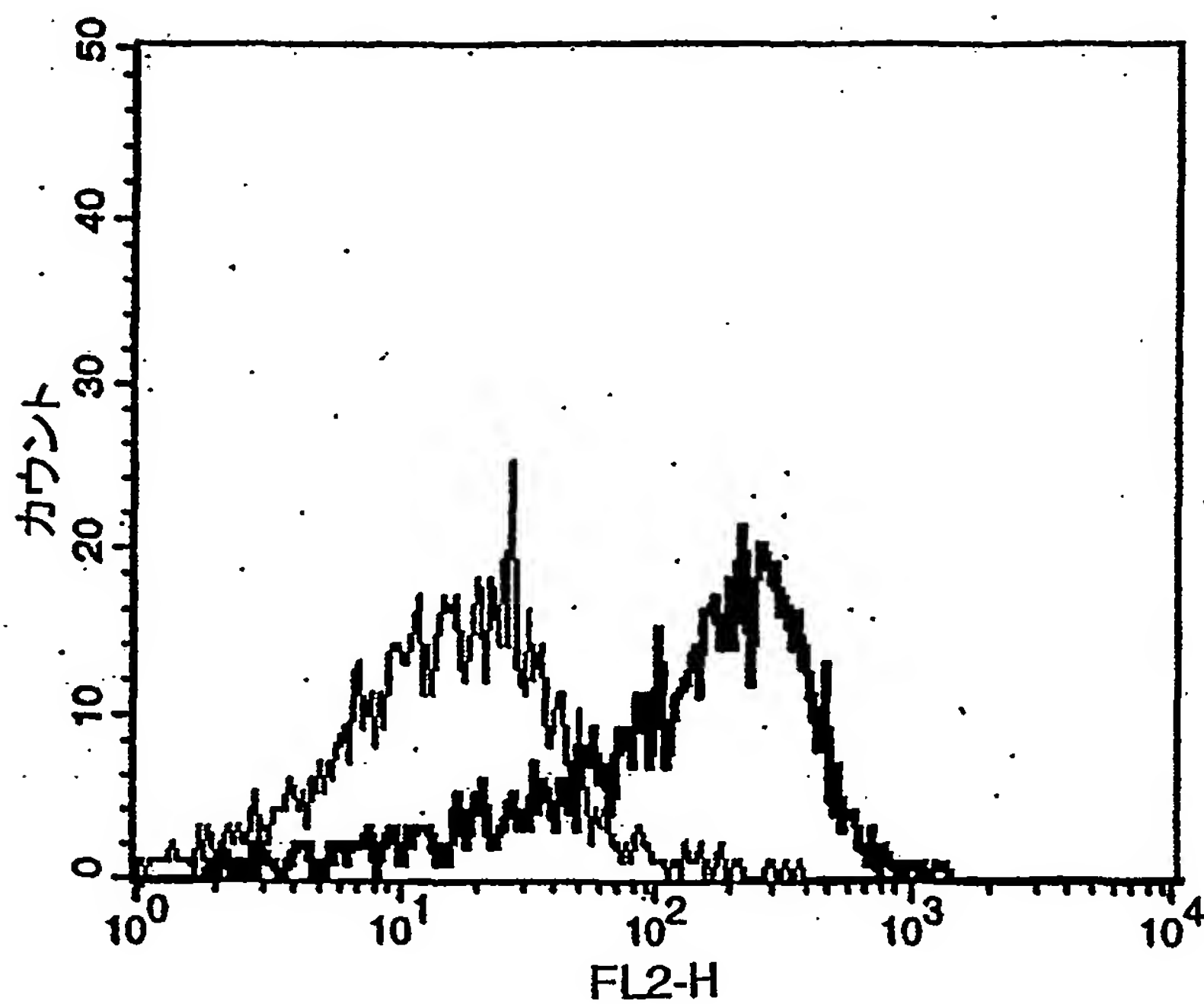
27. ヒト抗体である、請求項 1～26 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

28. 請求項 1～26 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む医薬組成物。

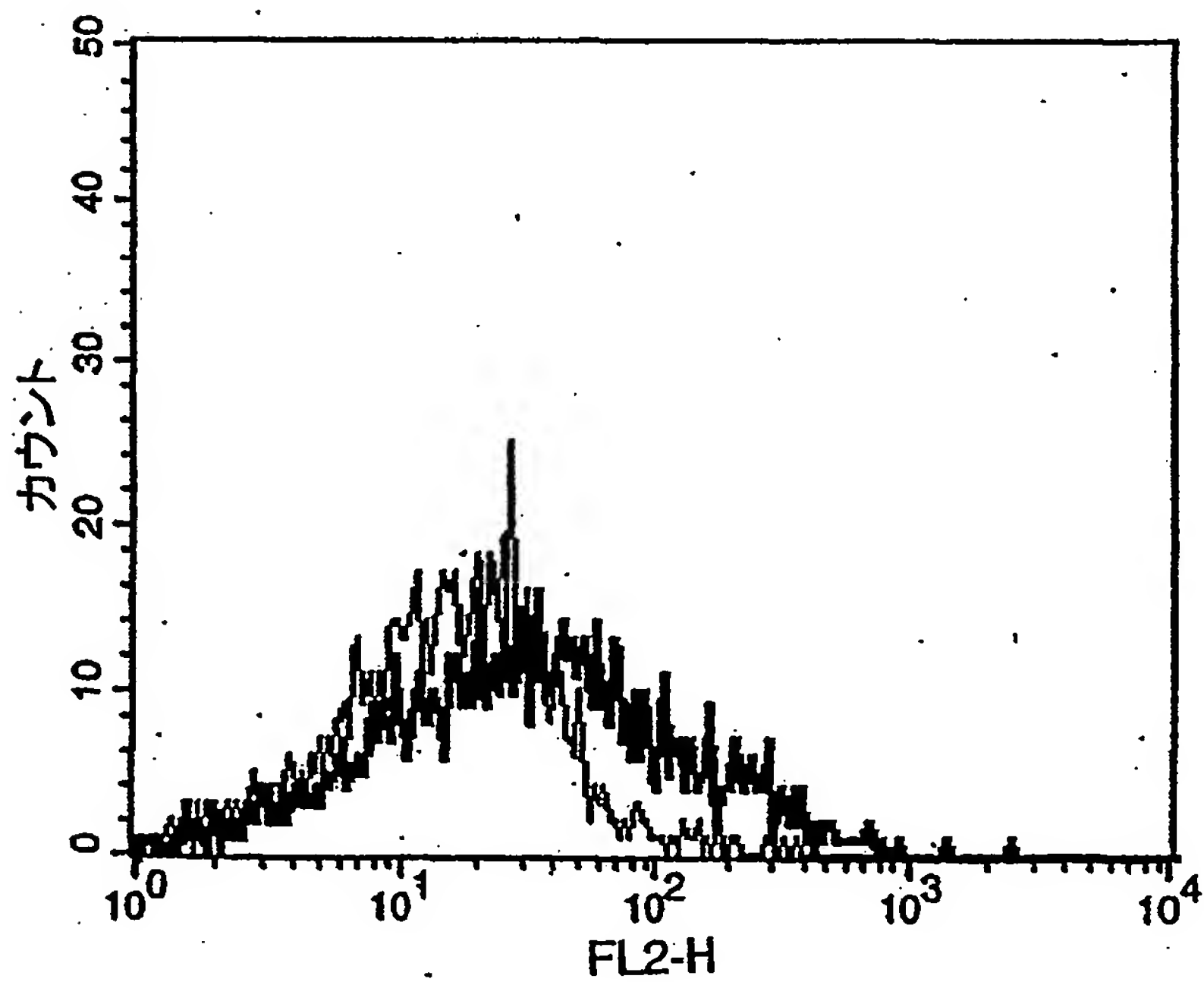
29. 請求項 1～16 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む、免疫賦活化剤、抗腫瘍剤又は自己免疫疾患治療剤。

30. 請求項 17～26 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む、免疫抑制剤、自己免疫疾患治療剤、アレルギー治療剤又は血液凝固第 VIII 因子阻害症候群治療剤。

図 1

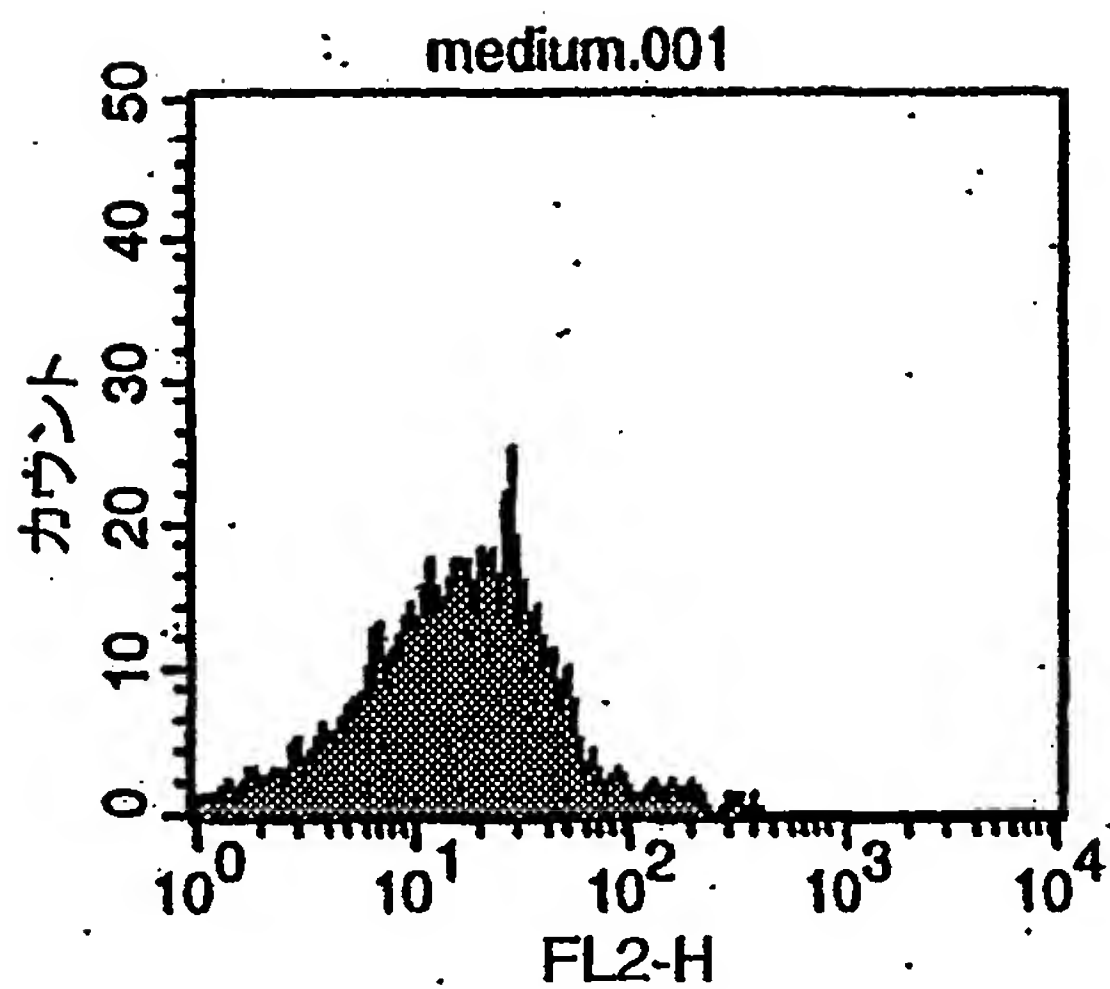


KM302-1抗体

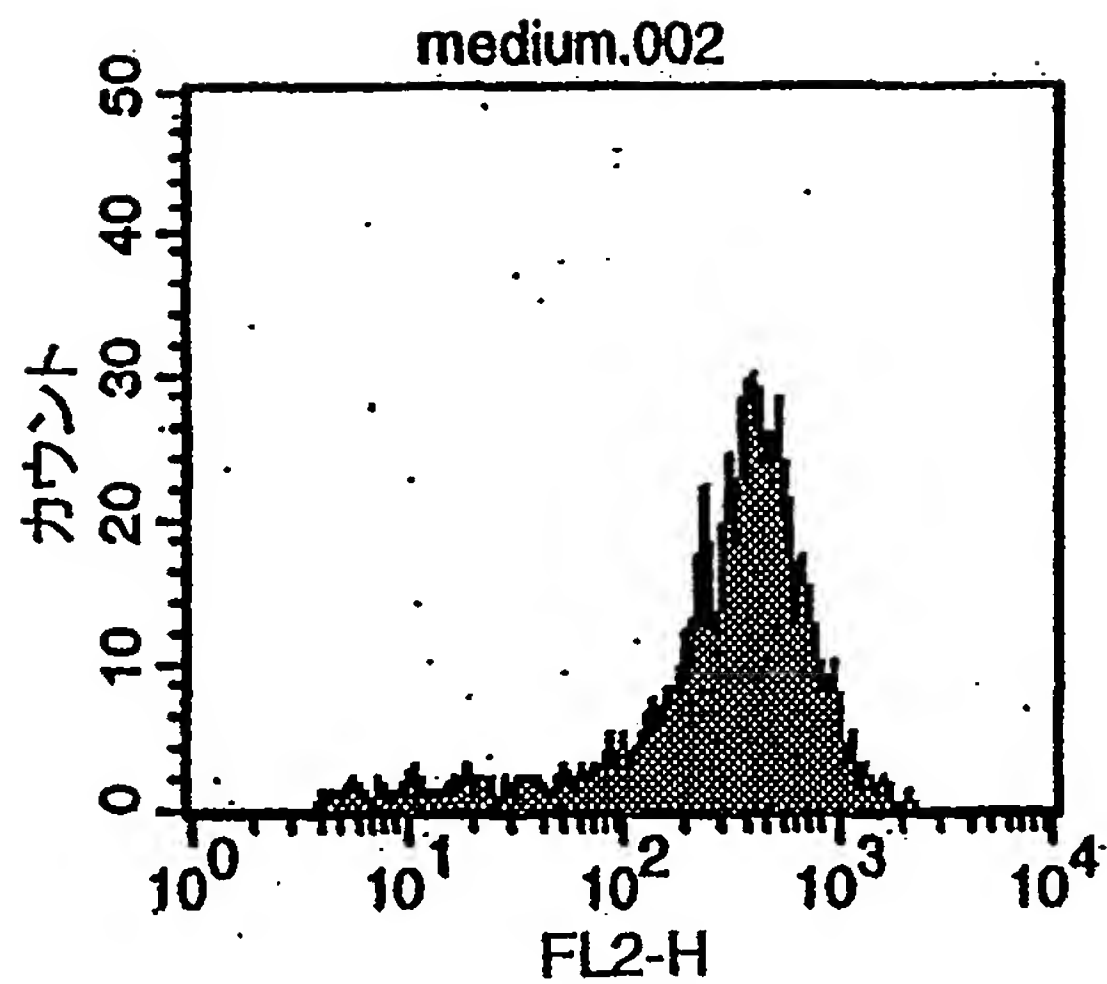


G28-5抗体

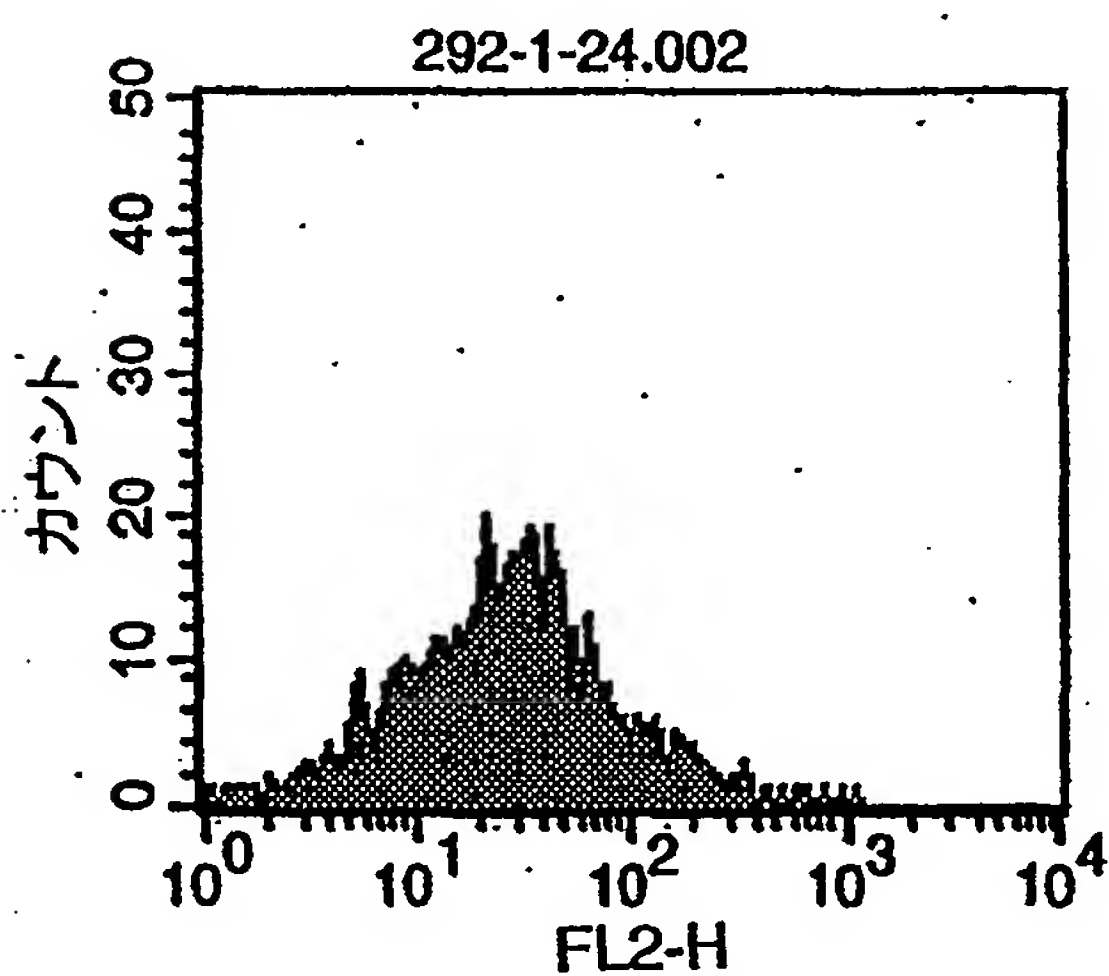
図 2A



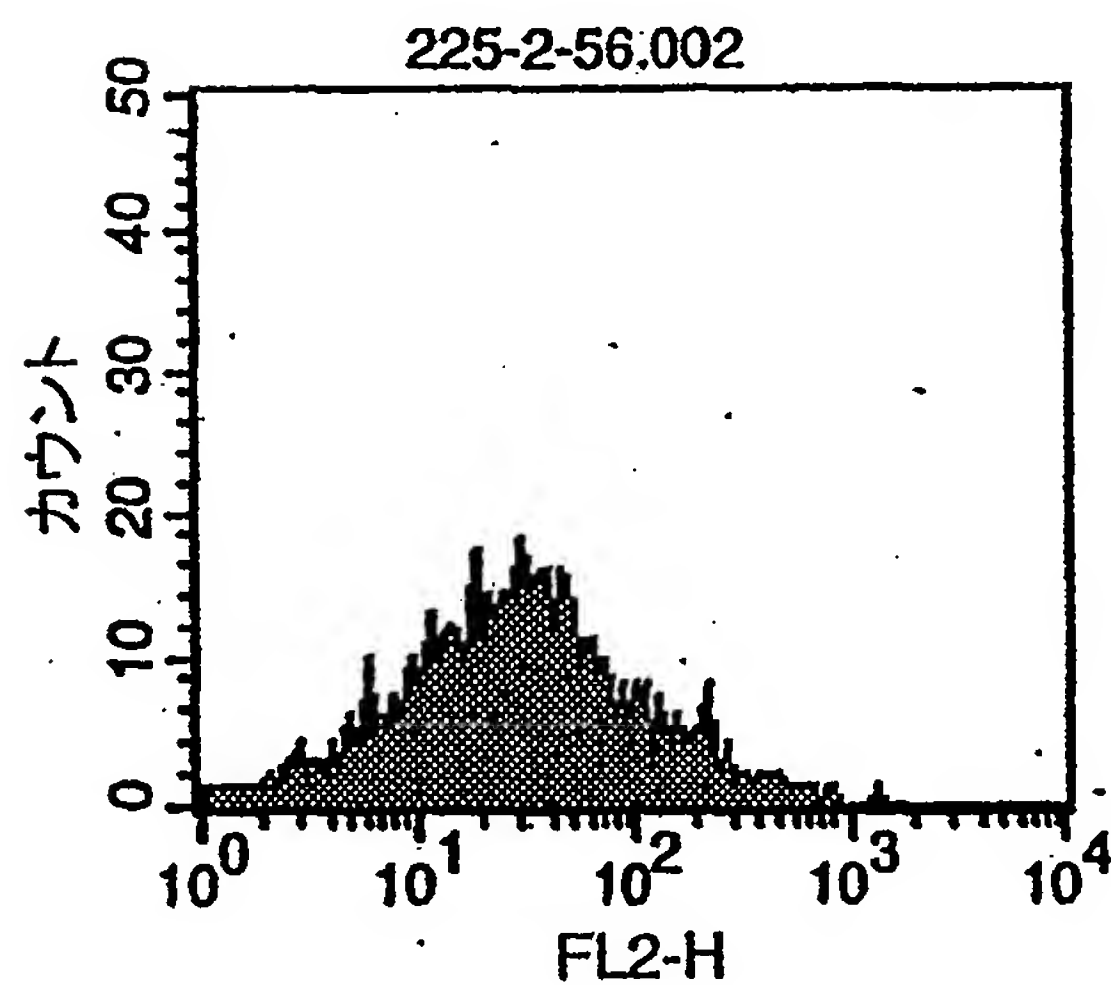
培地



CD40L

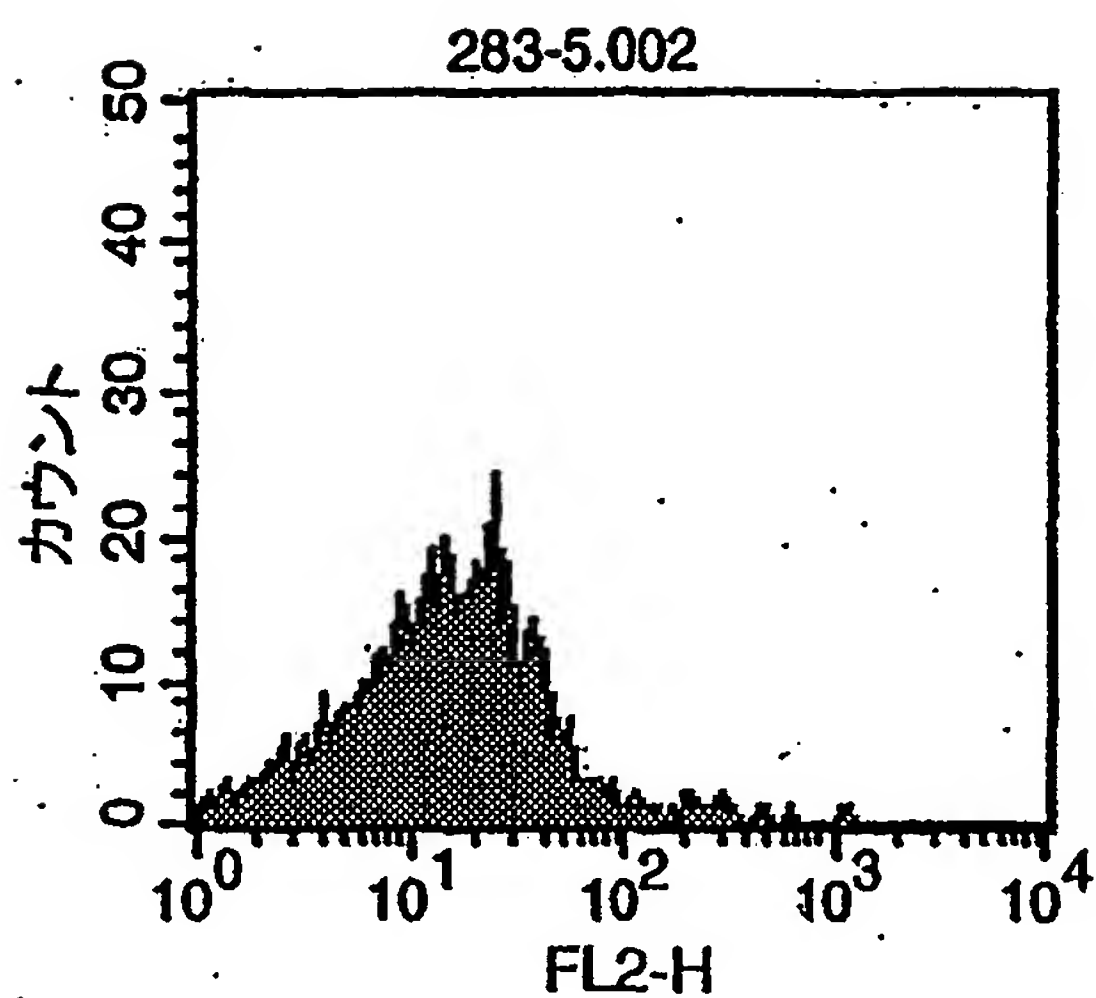


KM292-1-24抗体

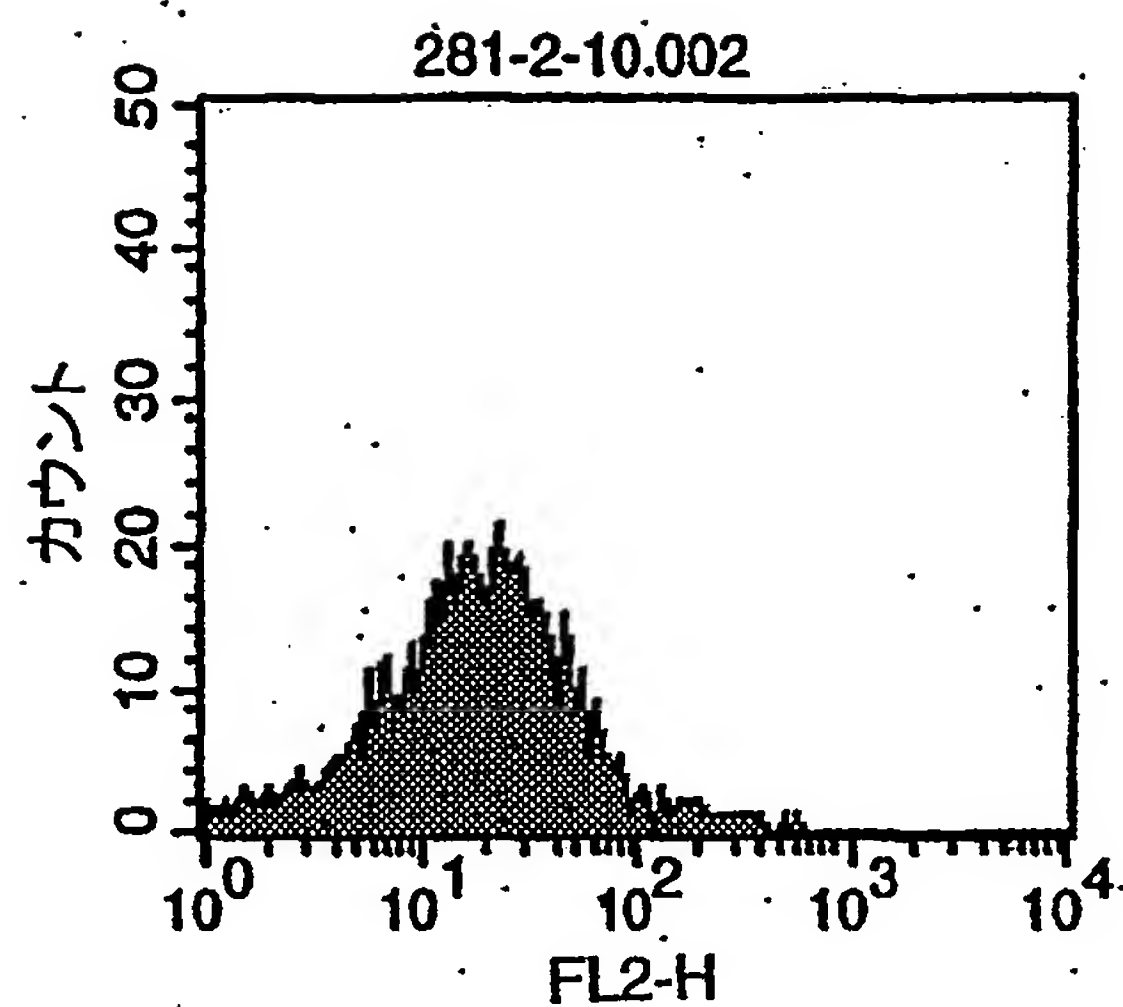


KM225-2-56抗体

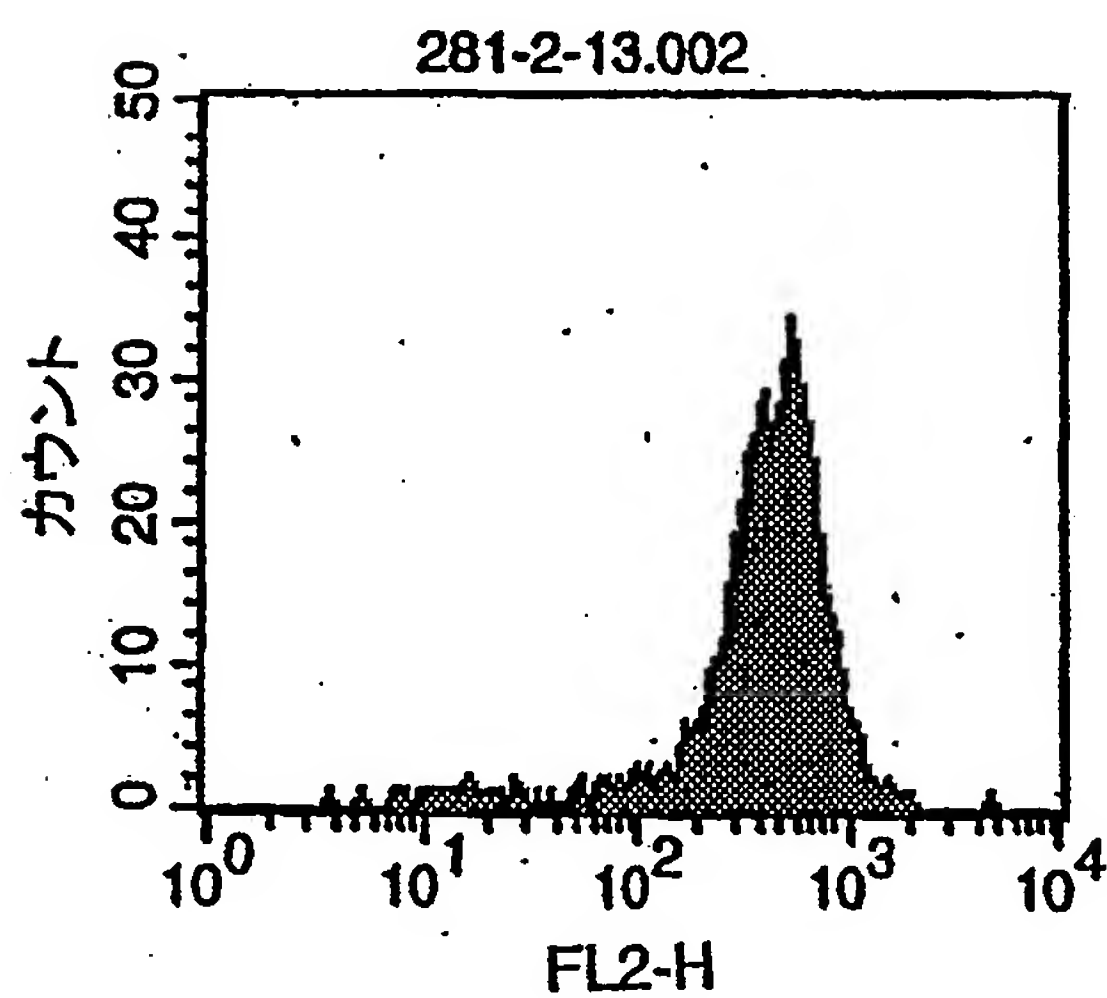
図 2B



KM283-5抗体



KM281-2-10-1-2抗体

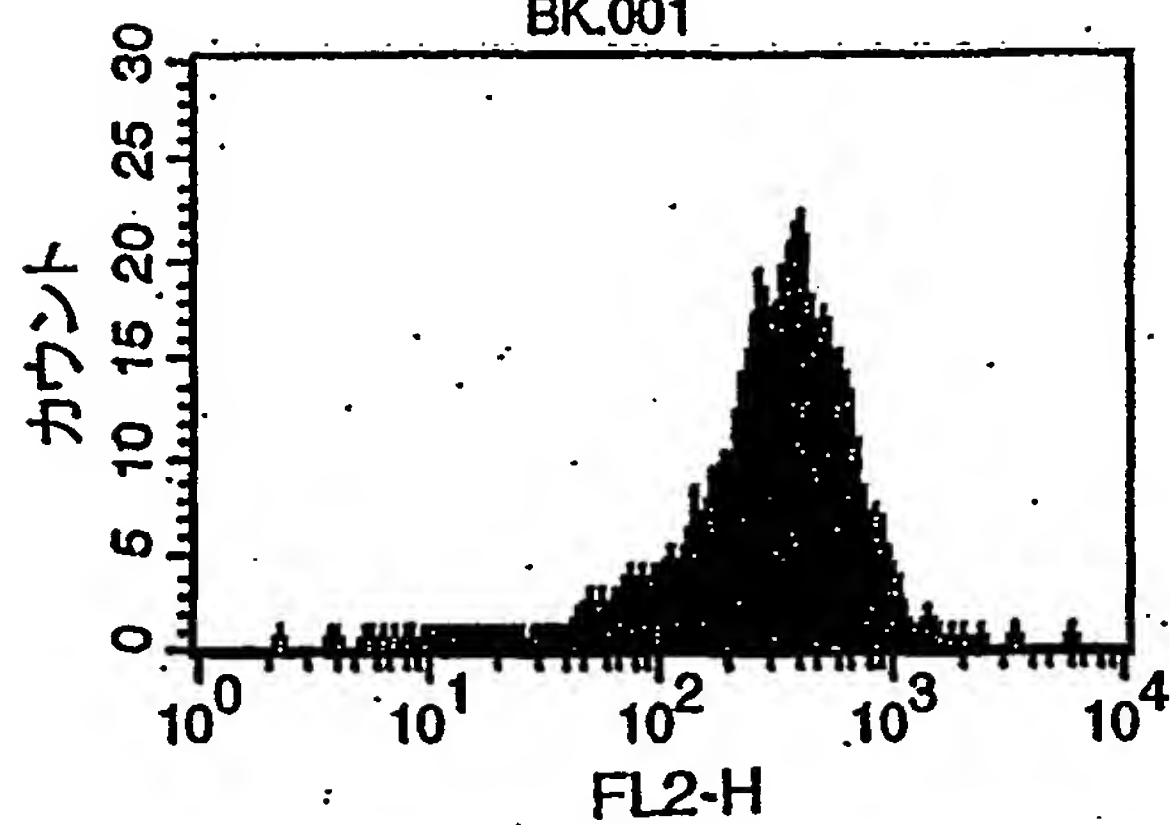


KM281-2-13抗体



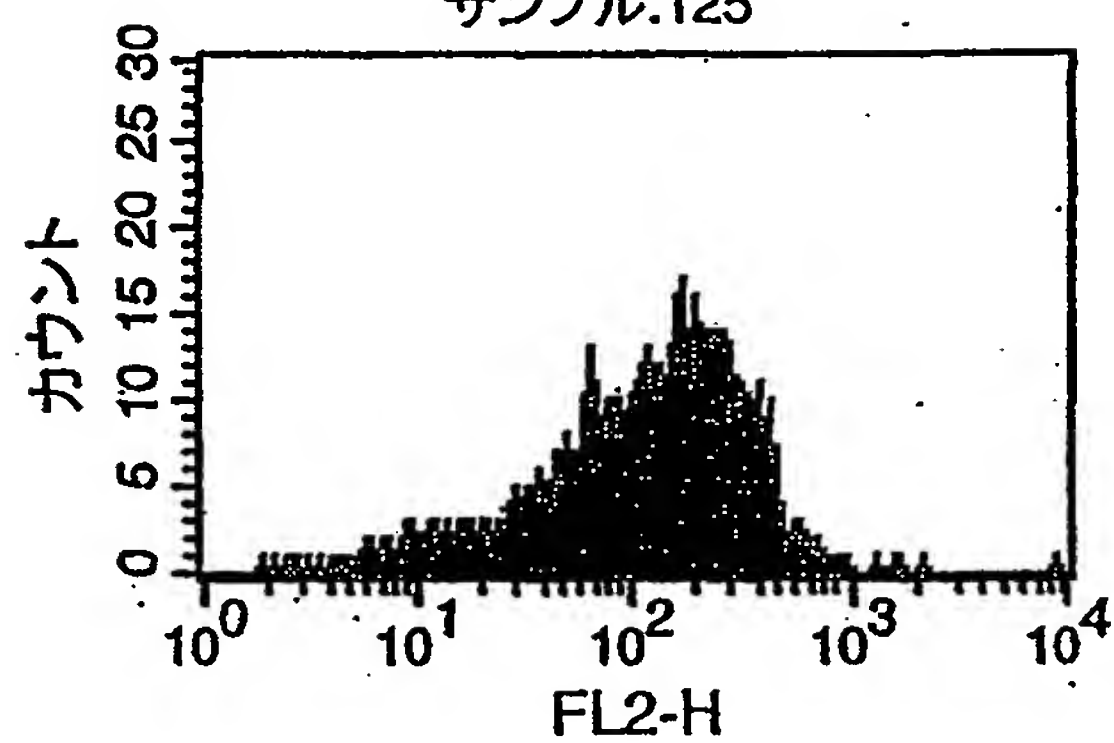
図 3

BK.001



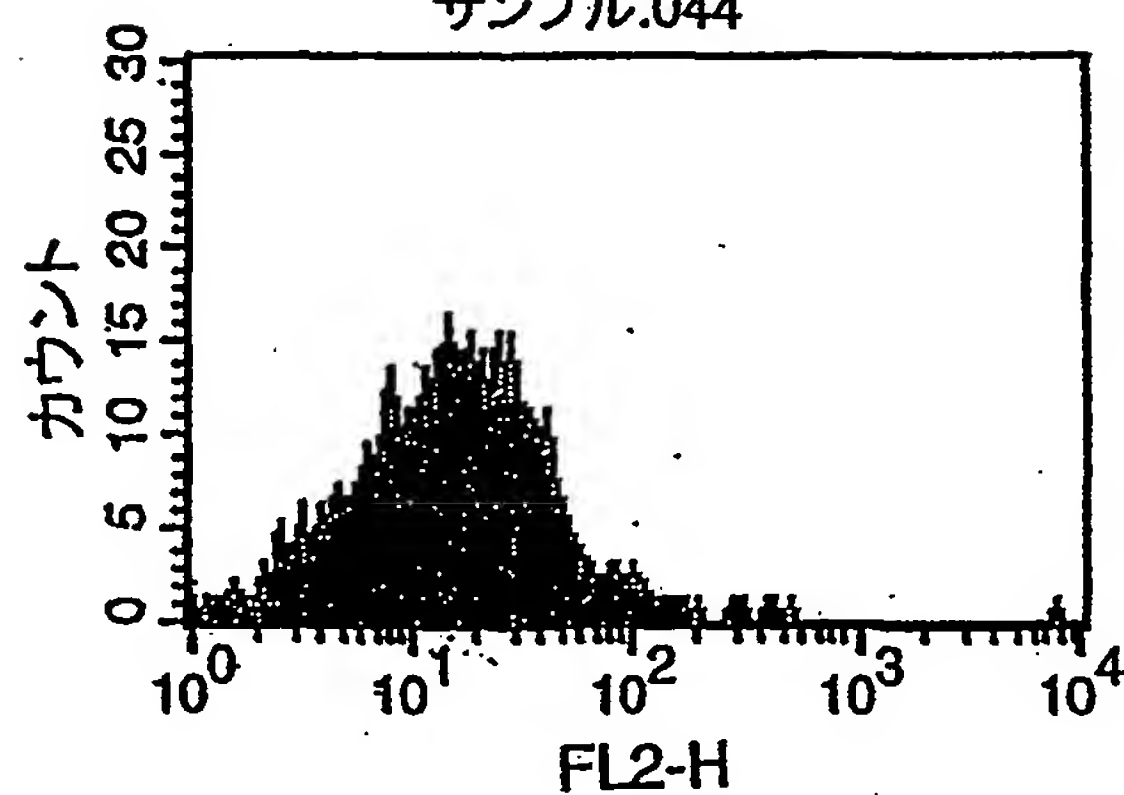
CD40Lのみ

サンプル.125



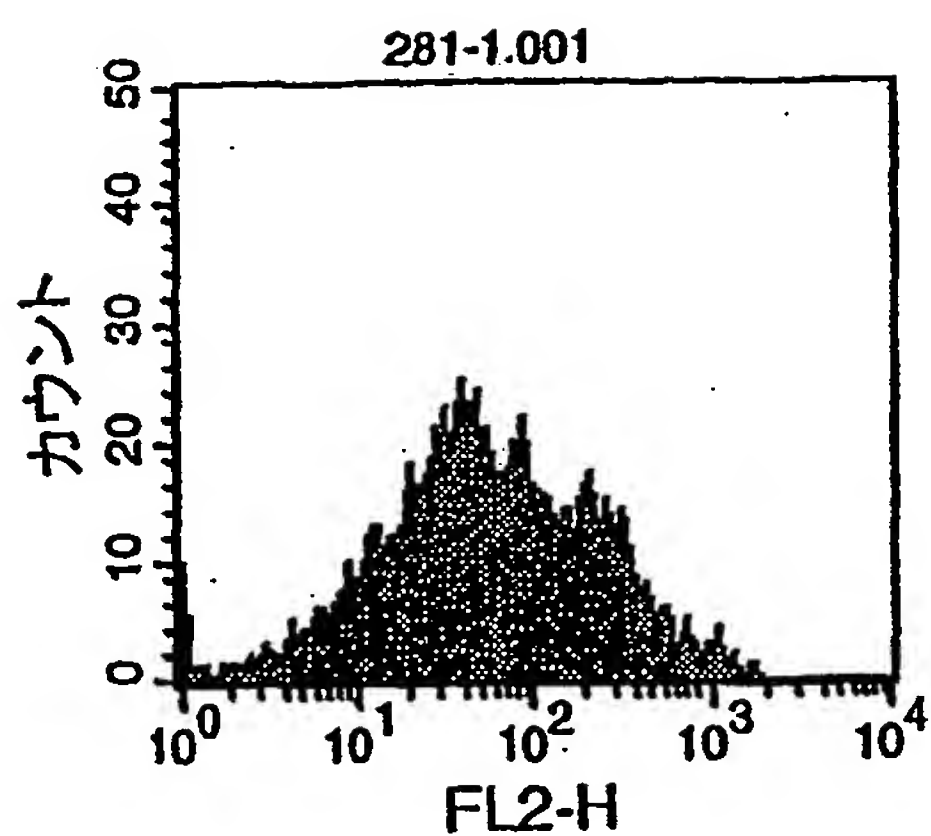
CD40L+5D12

サンプル.044

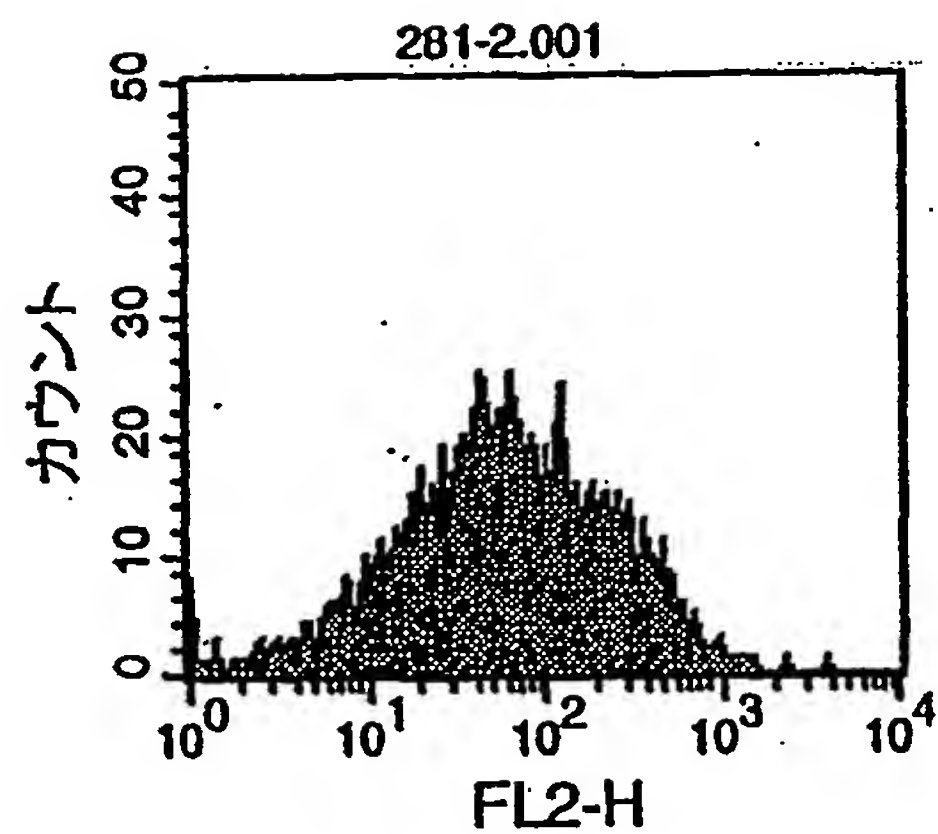


CD40L+KM281-1-10抗体

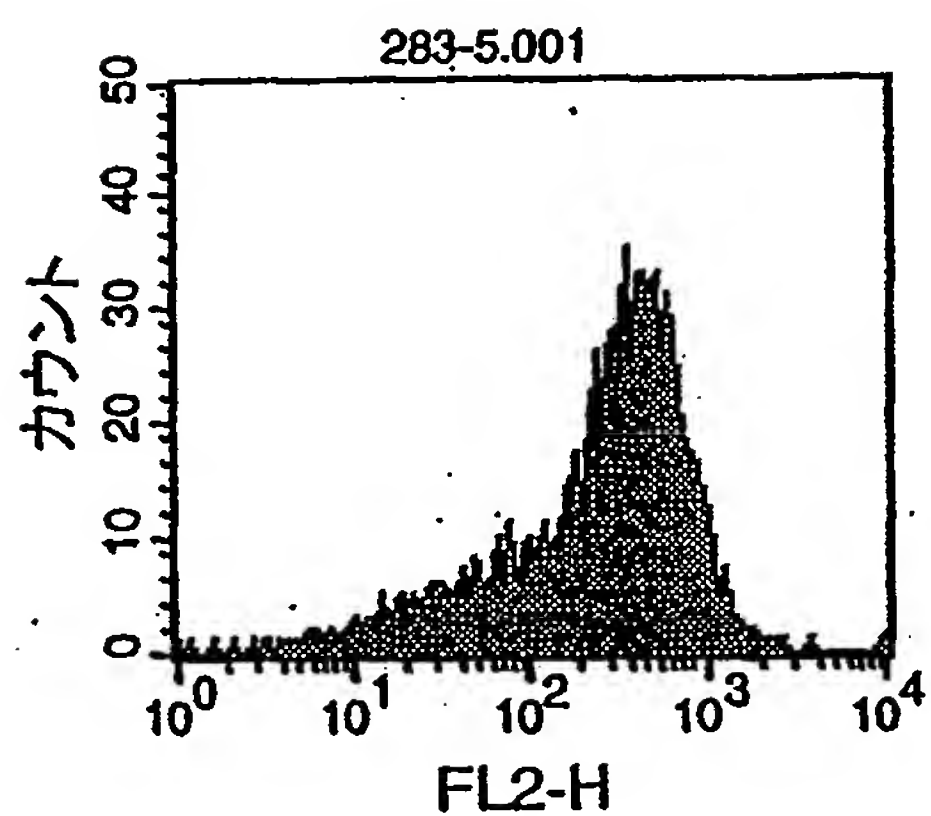
図 4



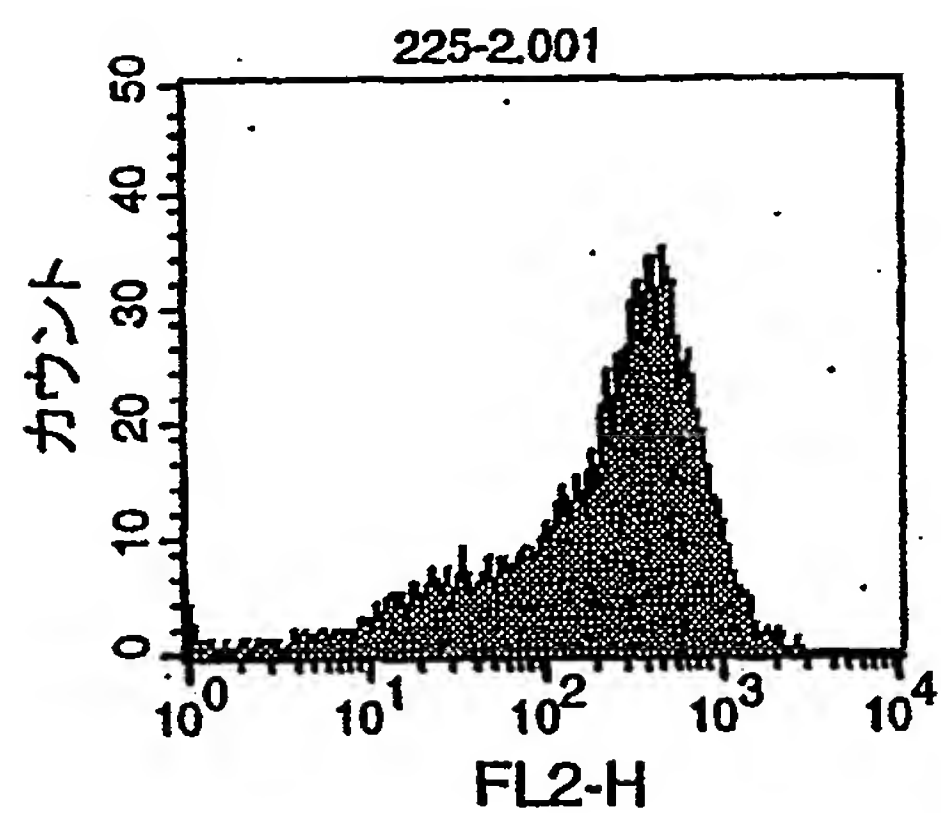
KM281-1-10抗体



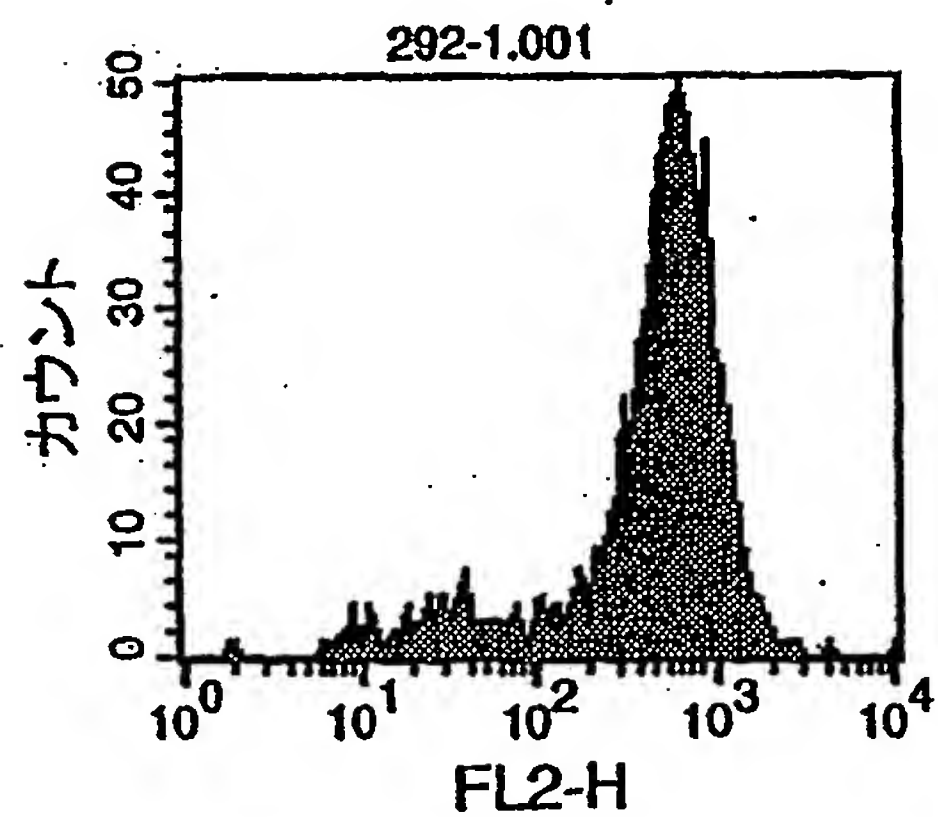
KM281-2-10-1-2抗体



KM283-5抗体

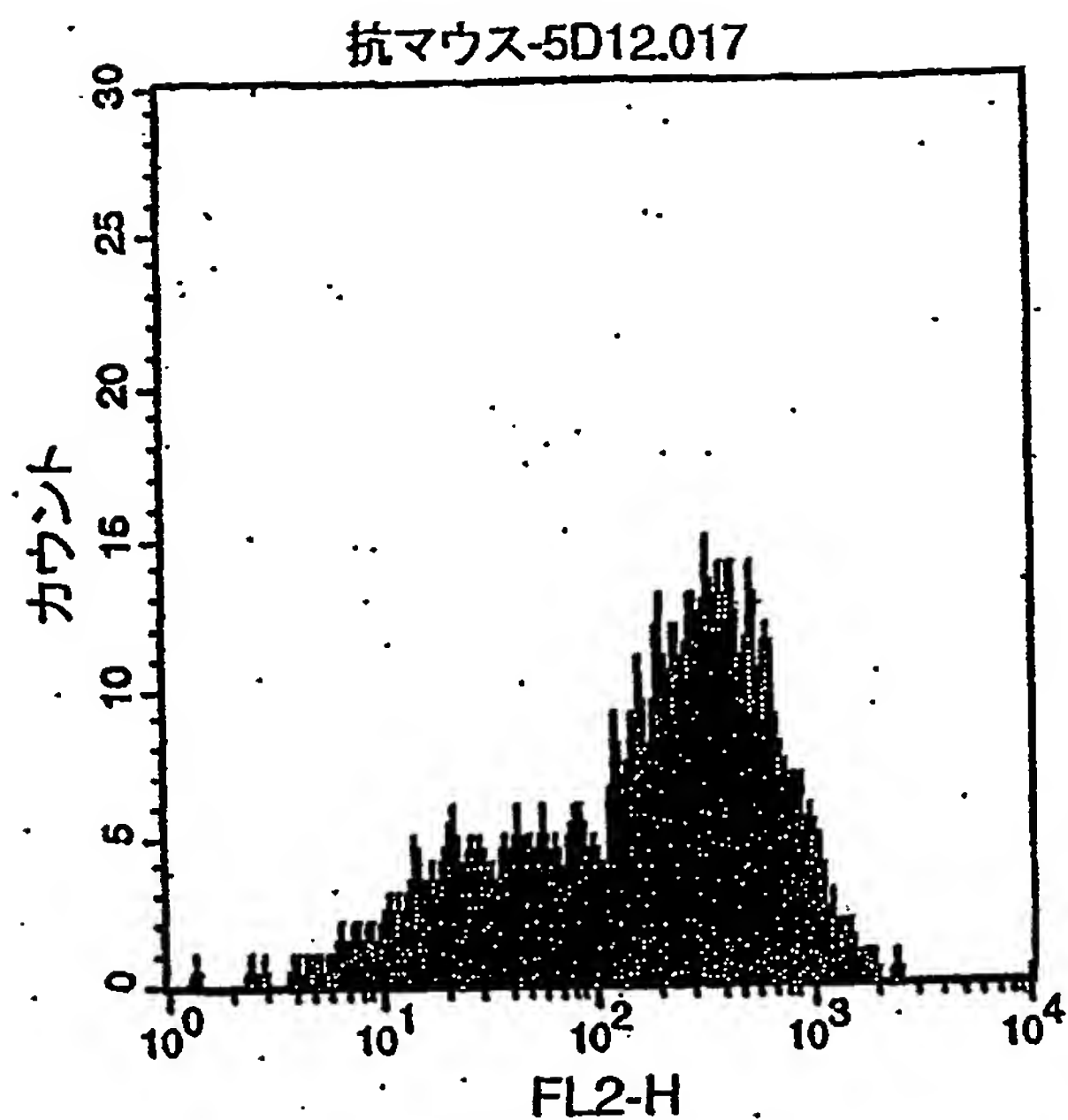


KM225-2-56抗体

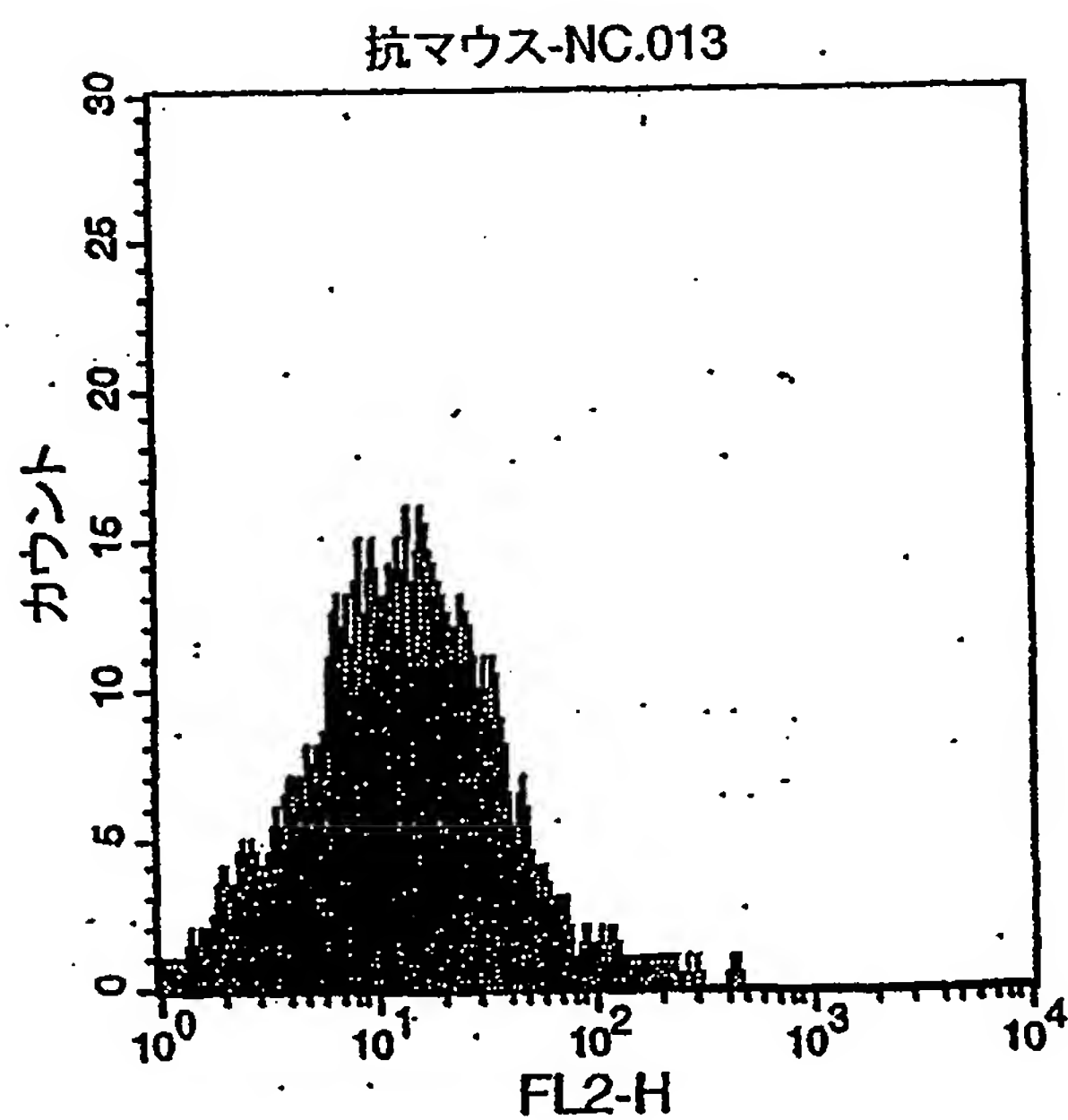


KM292-1-24抗体

図 5



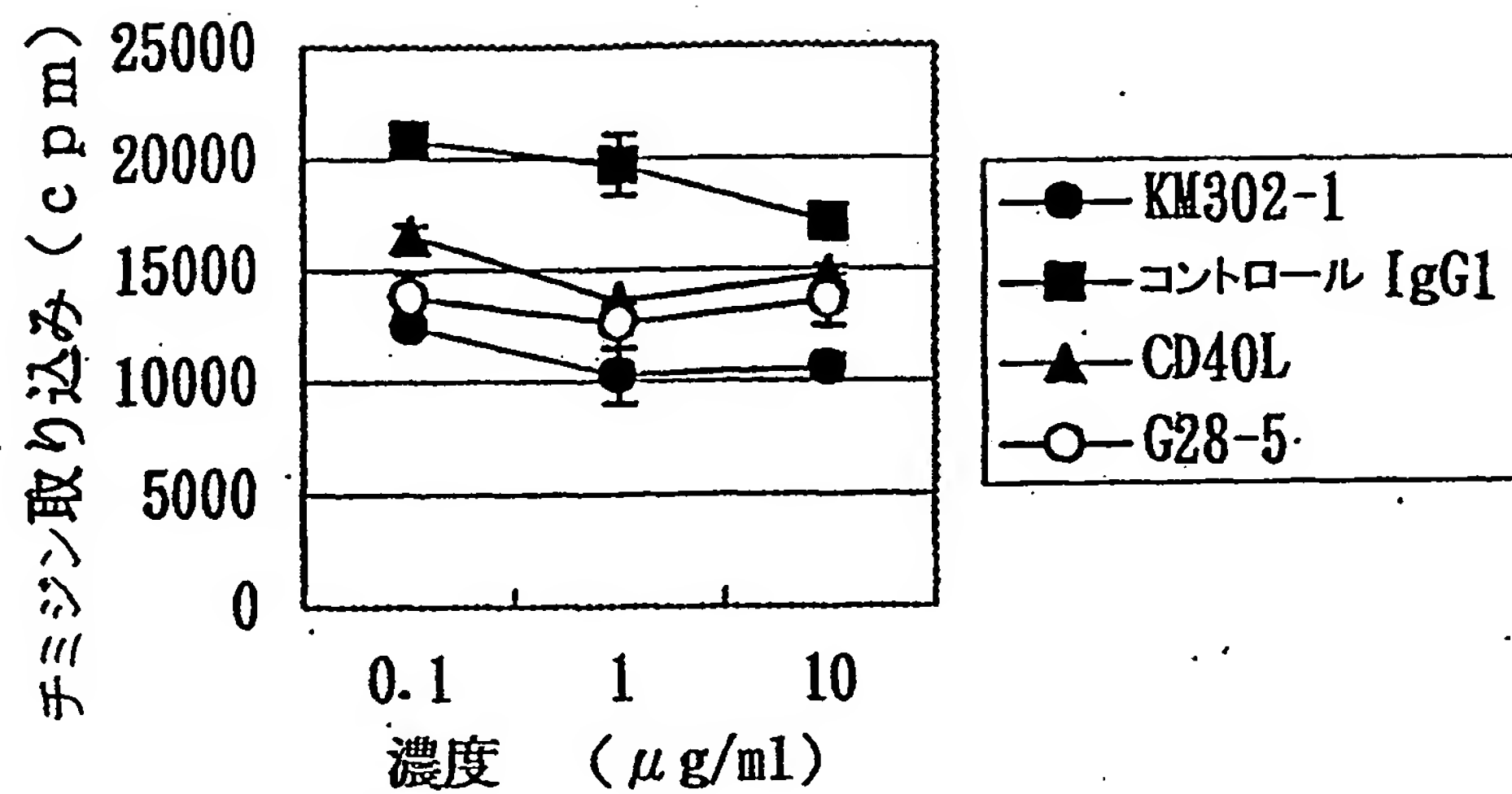
5D12抗体+抗マウスIgG抗体



抗マウスIgG抗体のみ

図 6

HS-Sulton



Ramos

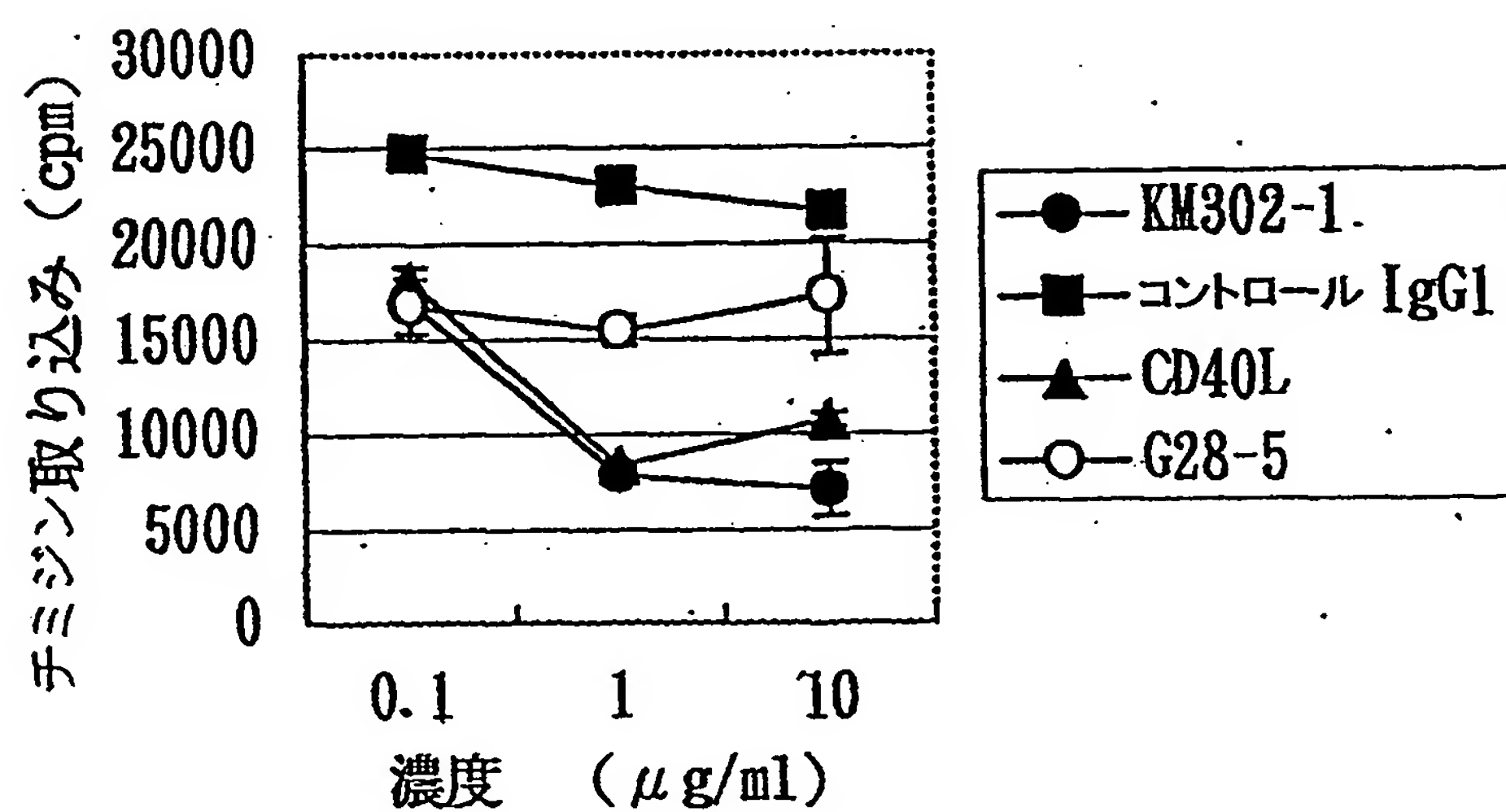
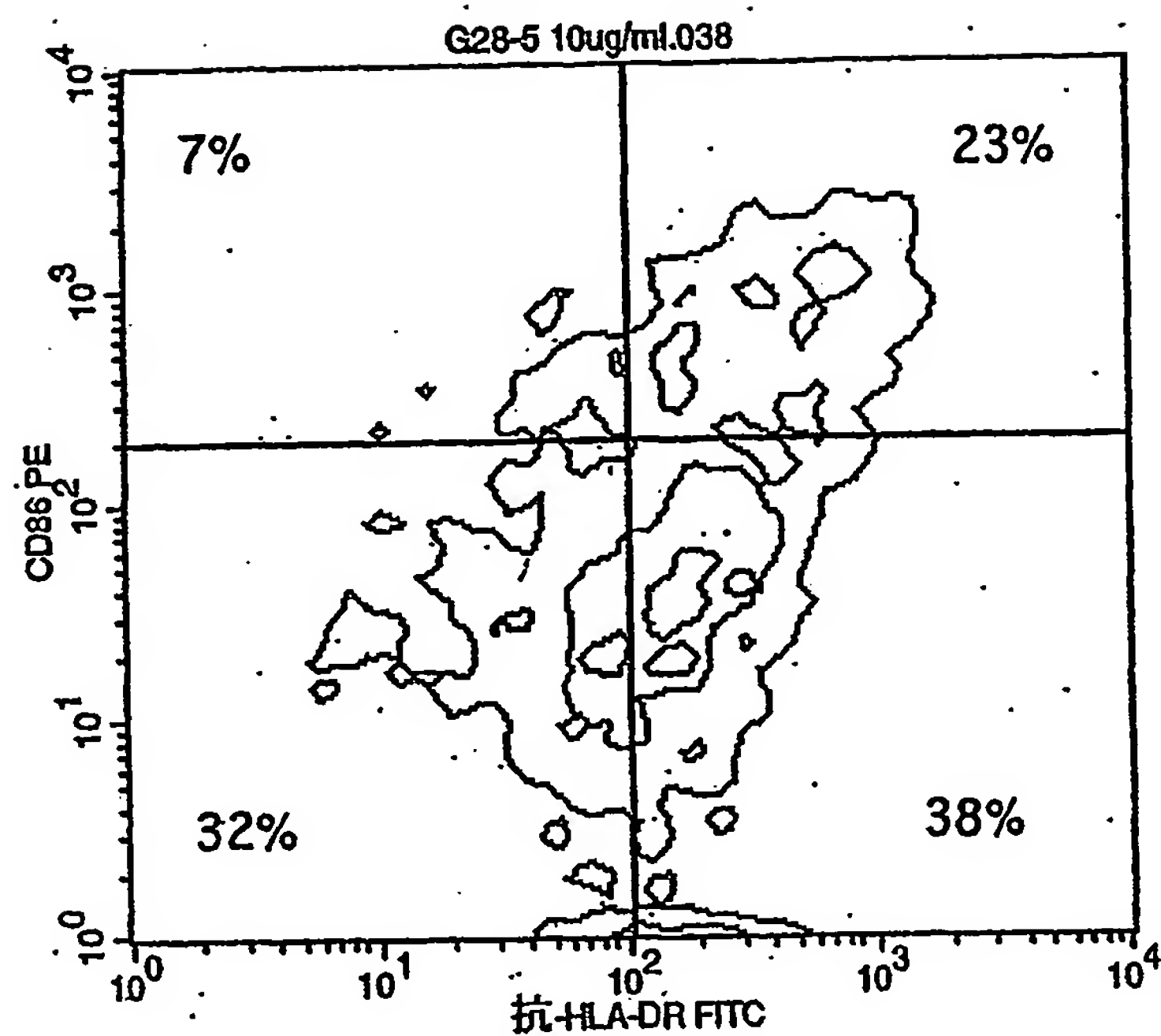
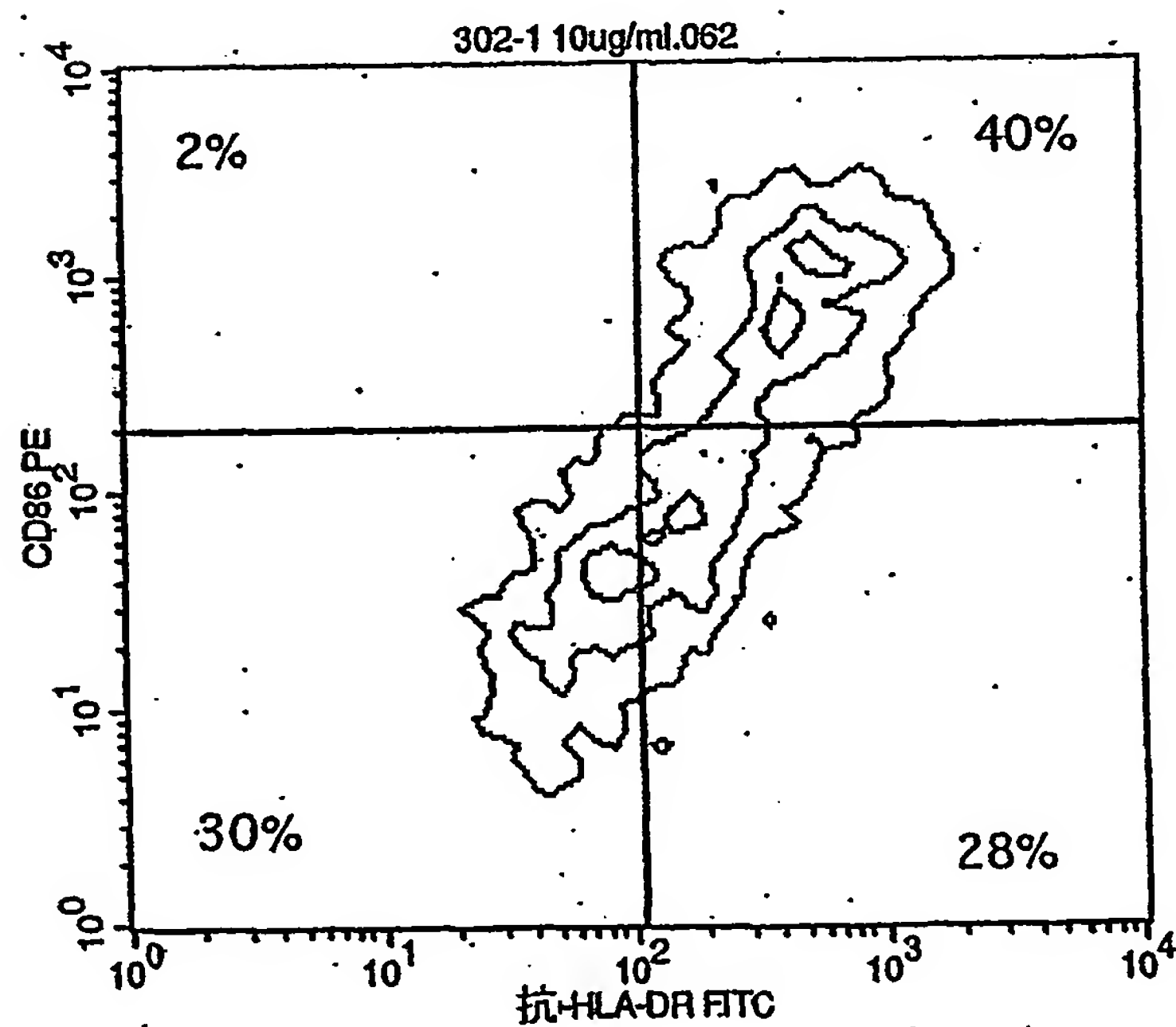




図 7



G28-5抗体



KM302-1抗体

図 8

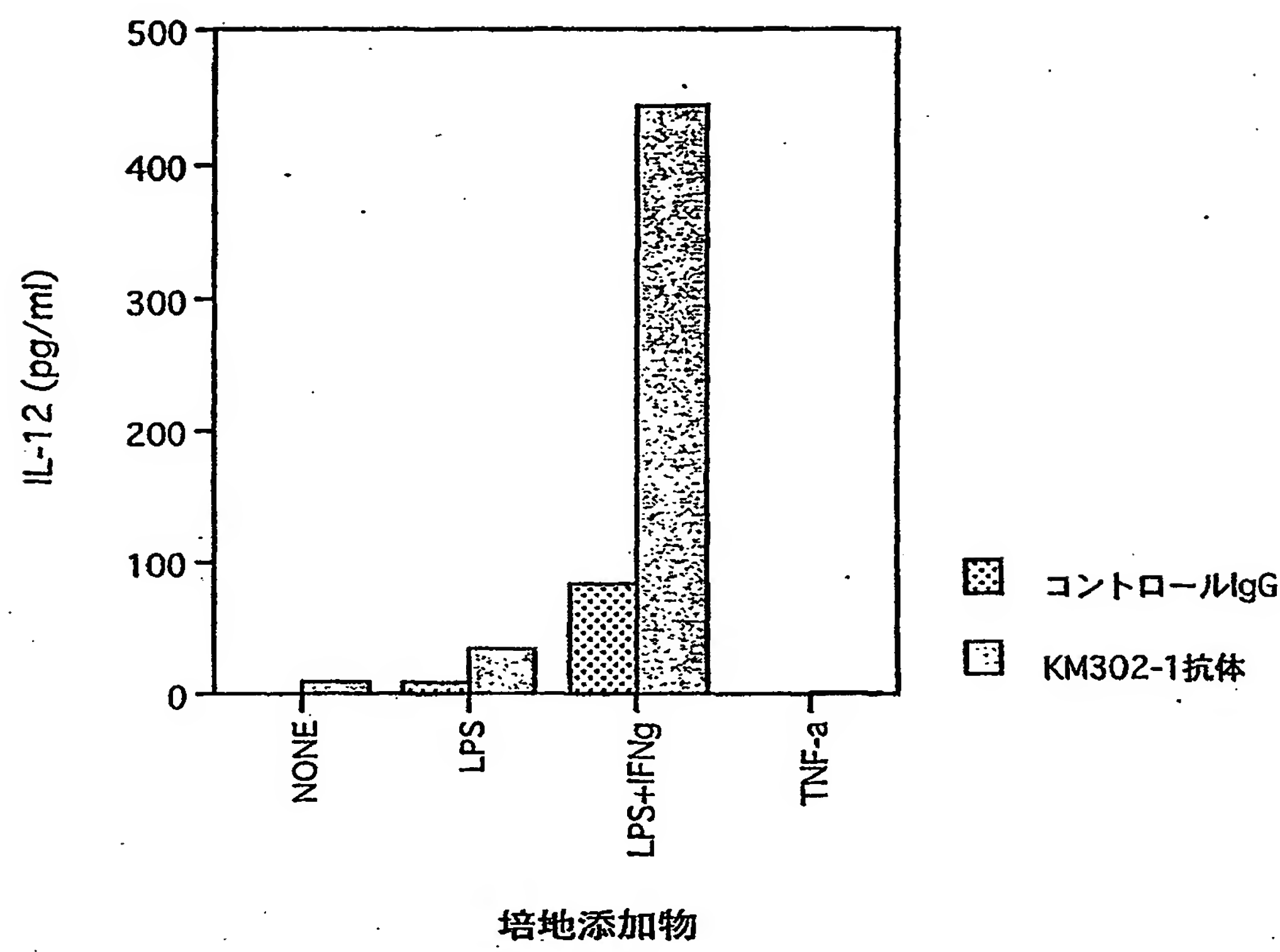


図 9

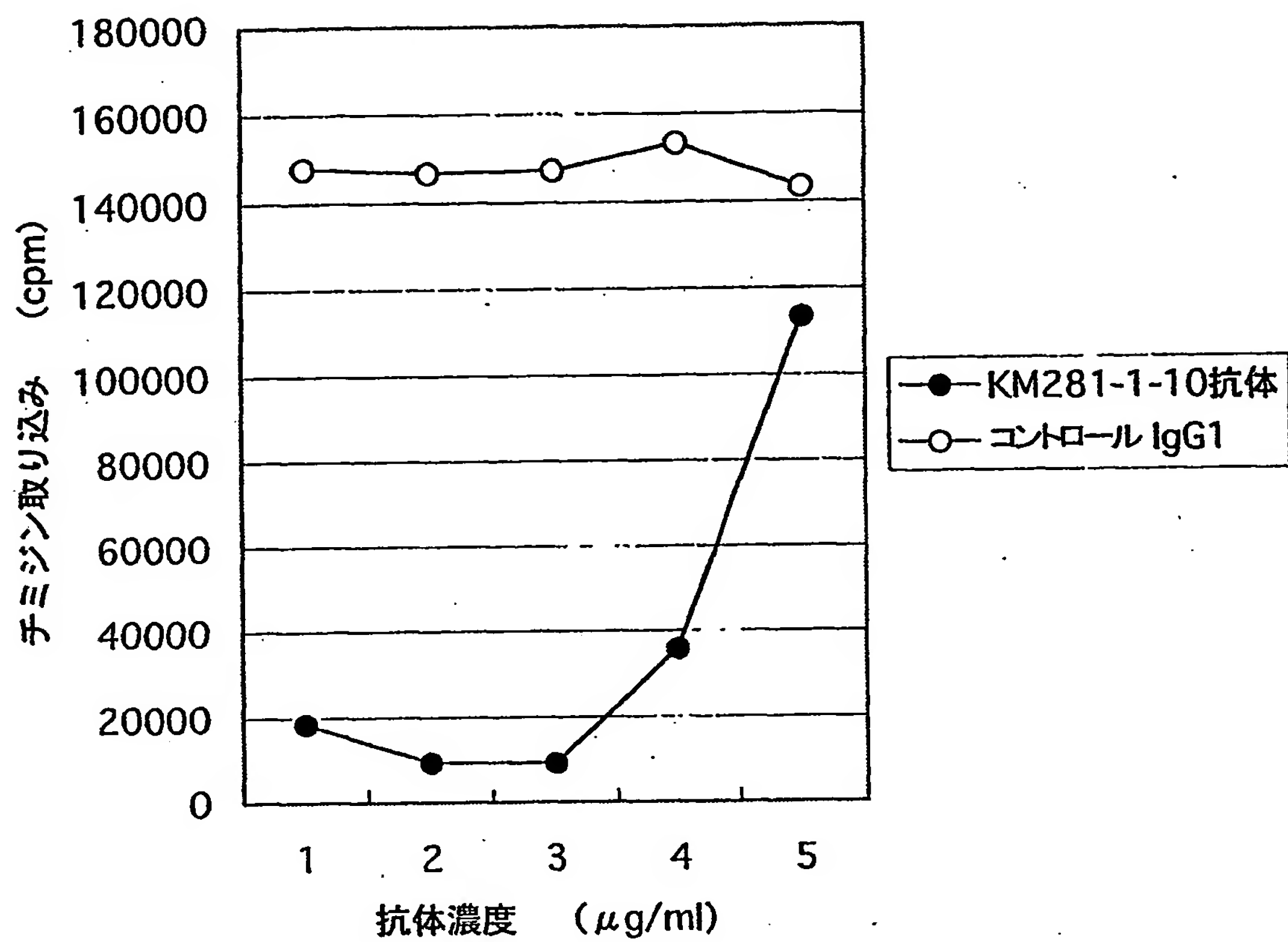


図 10

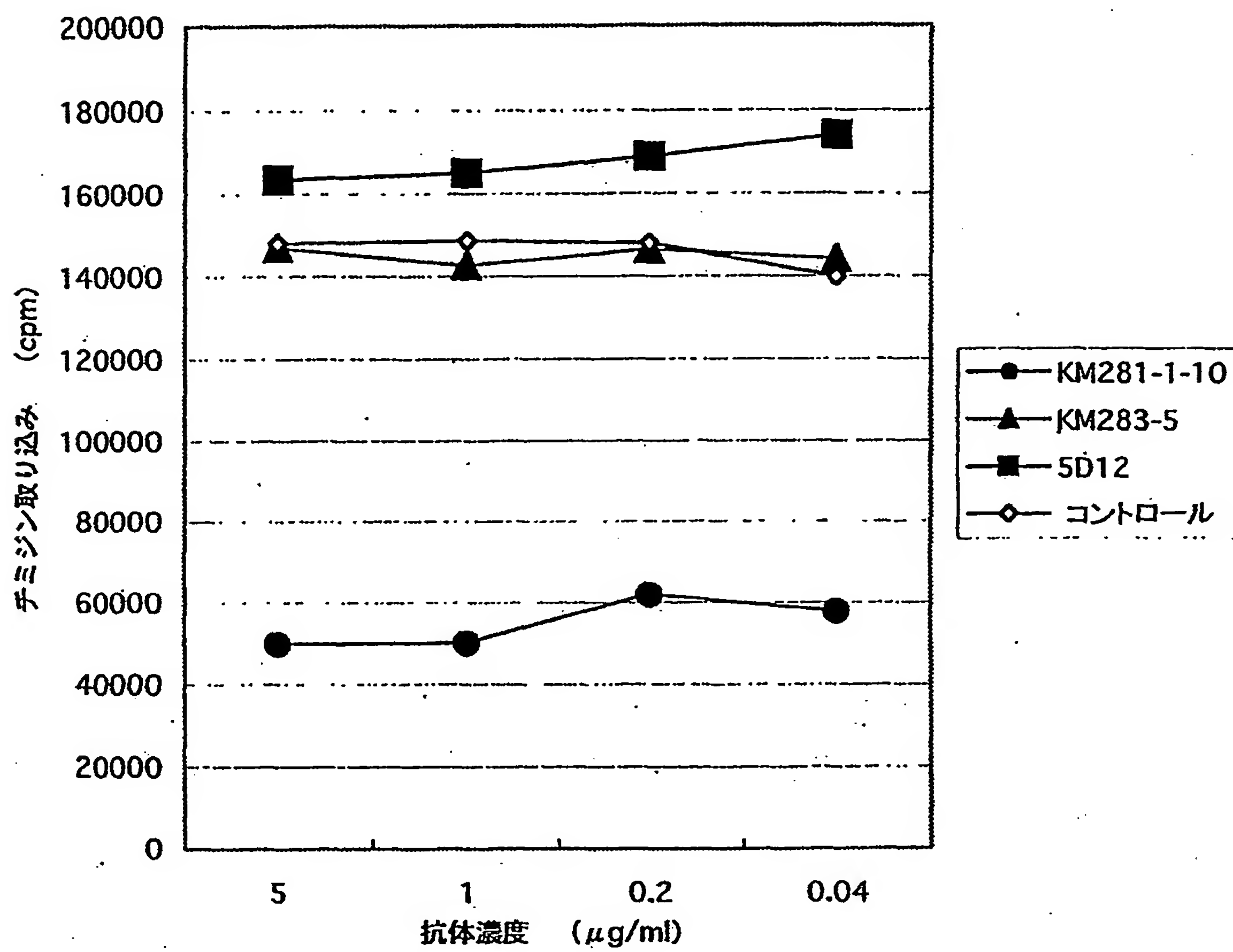




図 1 1

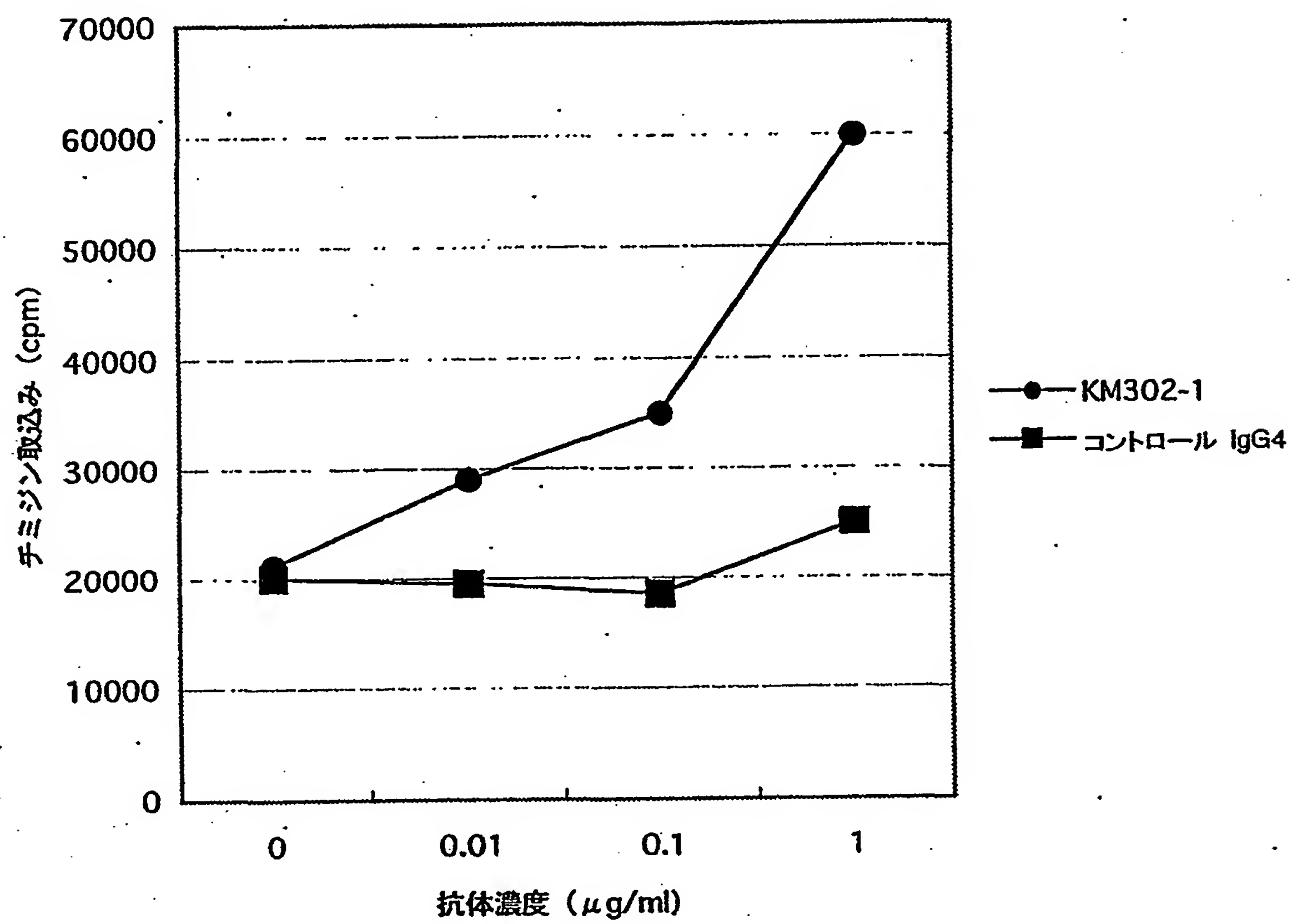


図 1 2

## 抗CD40アゴニスト抗体によるRamos細胞のCD95発現増加作用

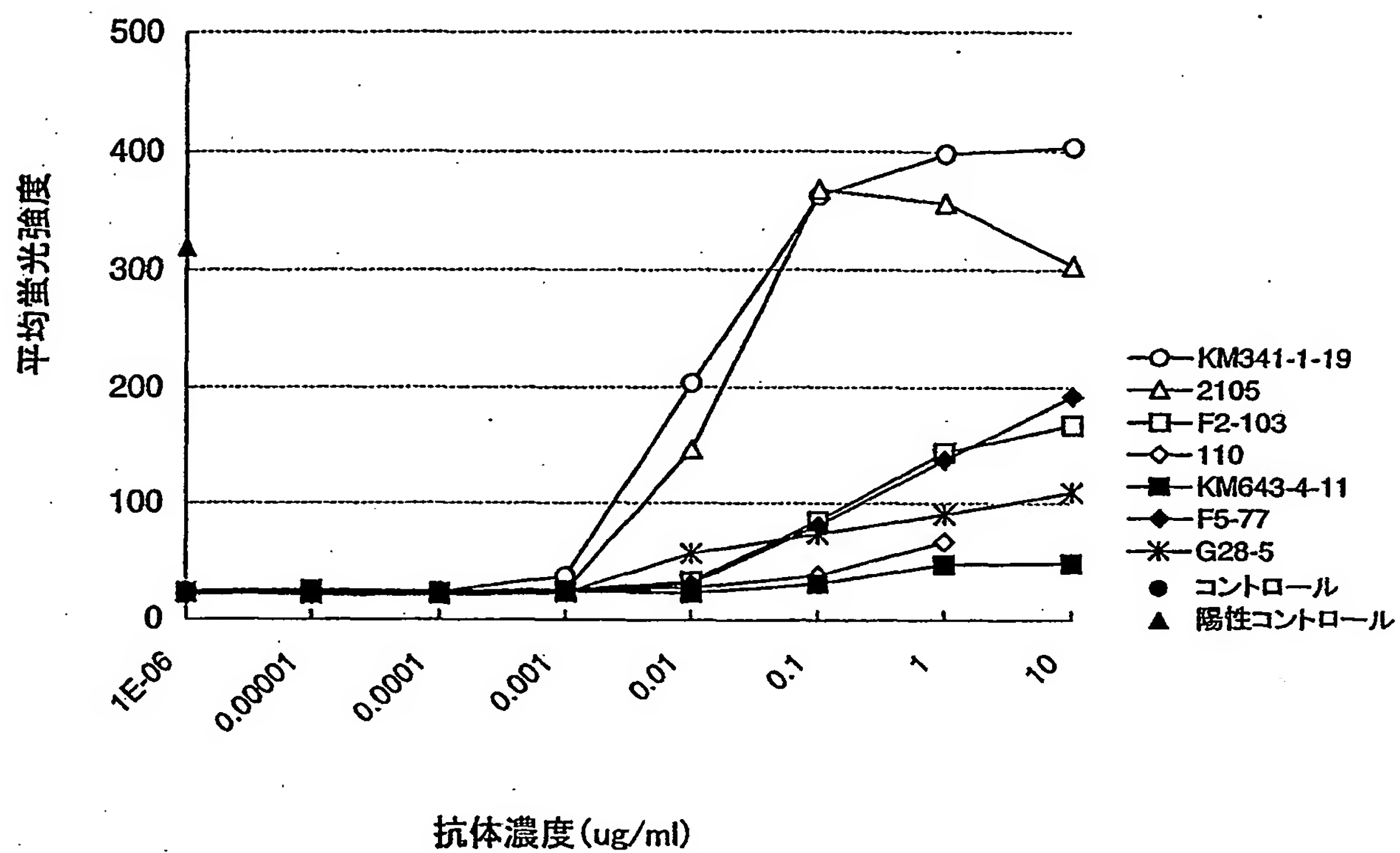


図1 3

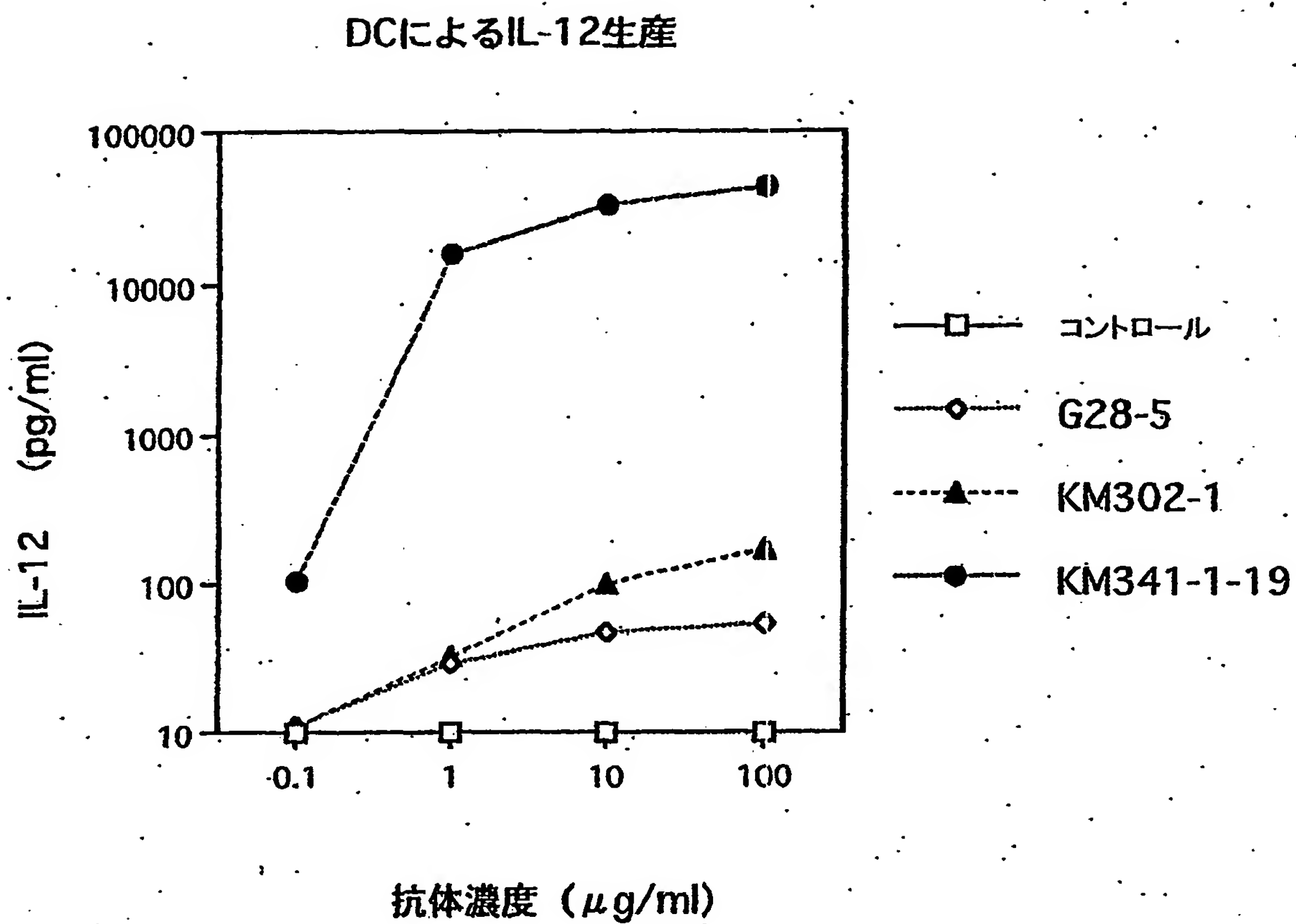


図 1 4

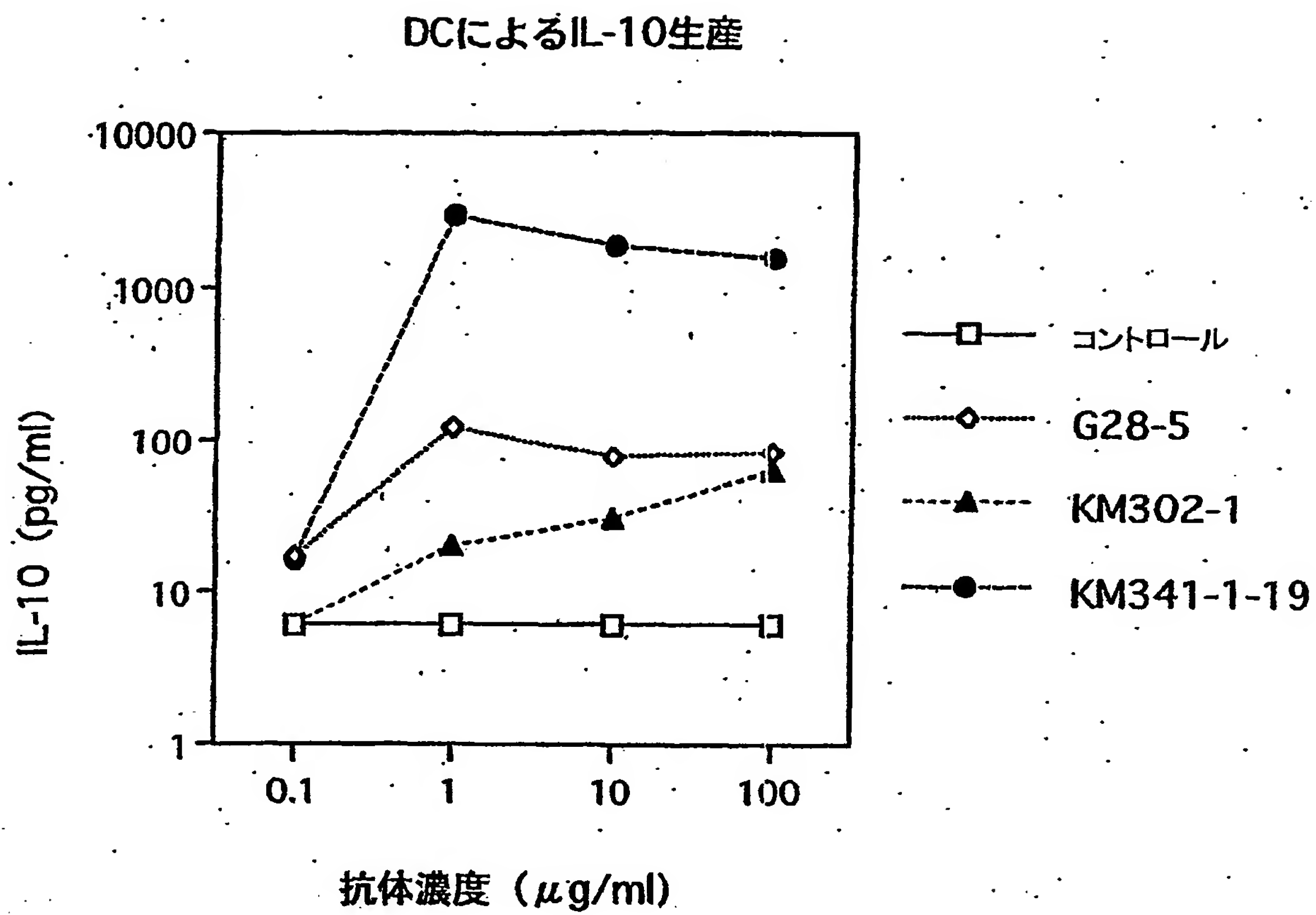




図 1 5

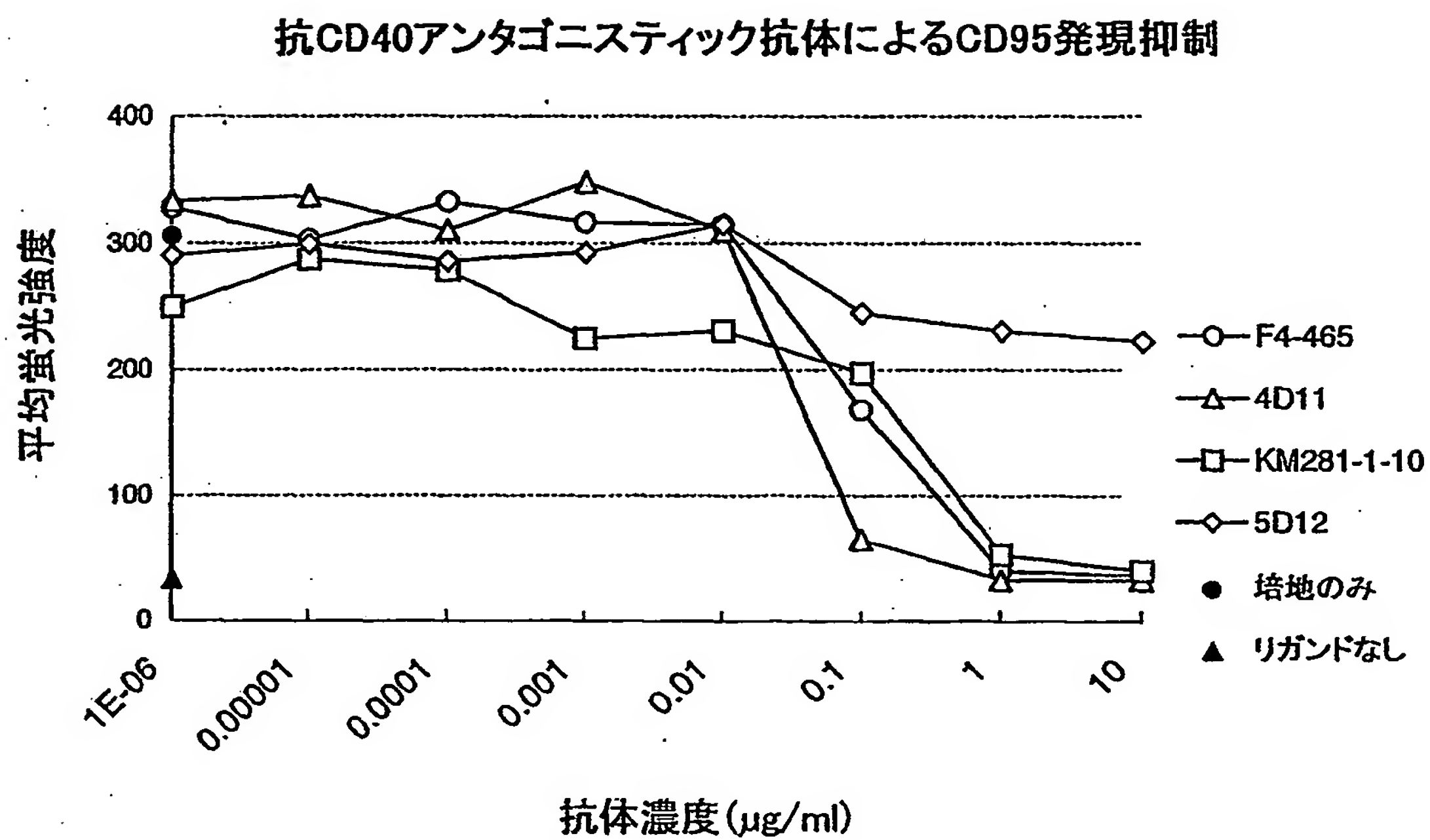


図 1 6

## Ramos細胞移植モデルにおける抗CD40抗体の抗腫瘍効果

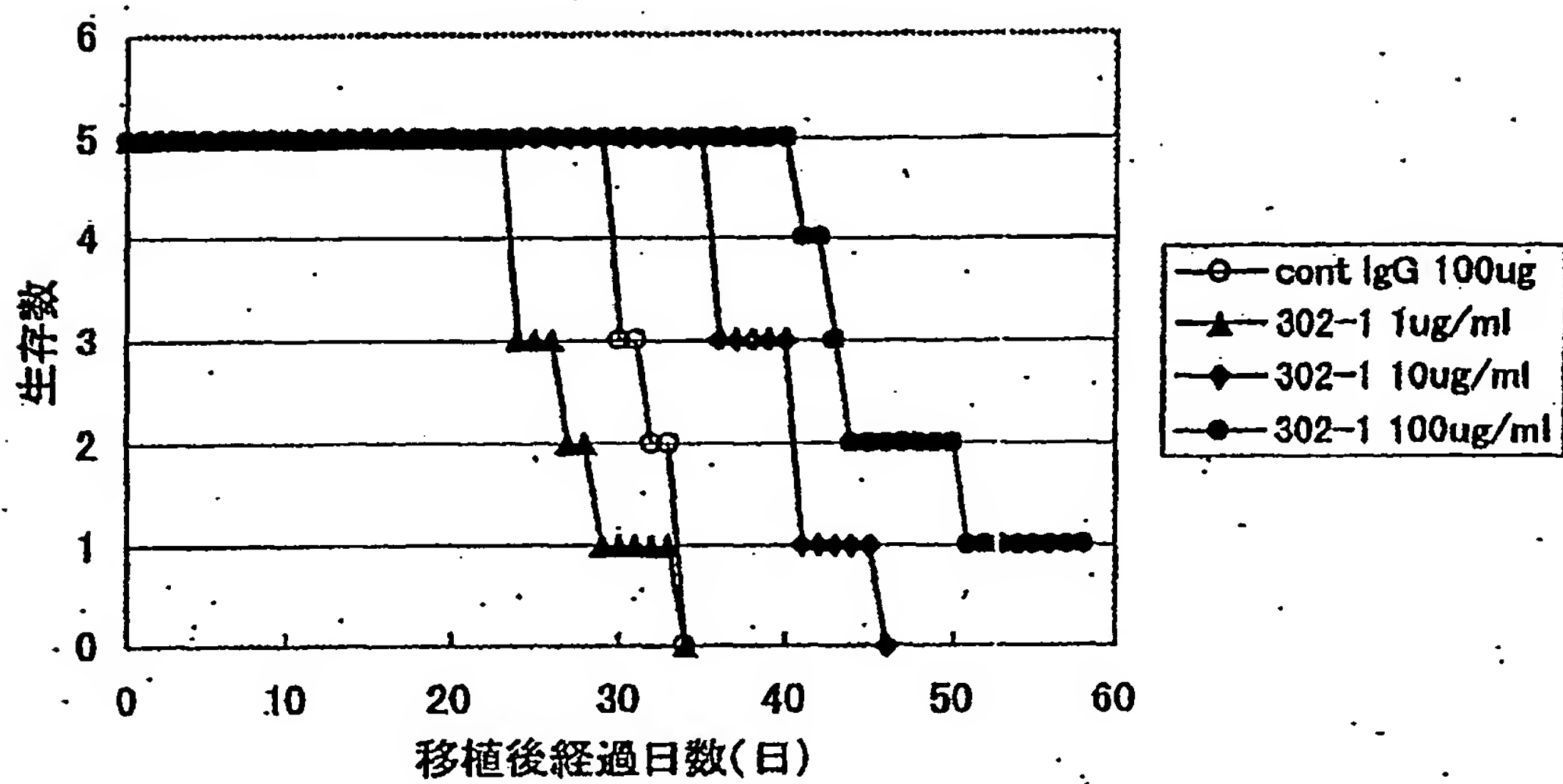


図 1 7 A

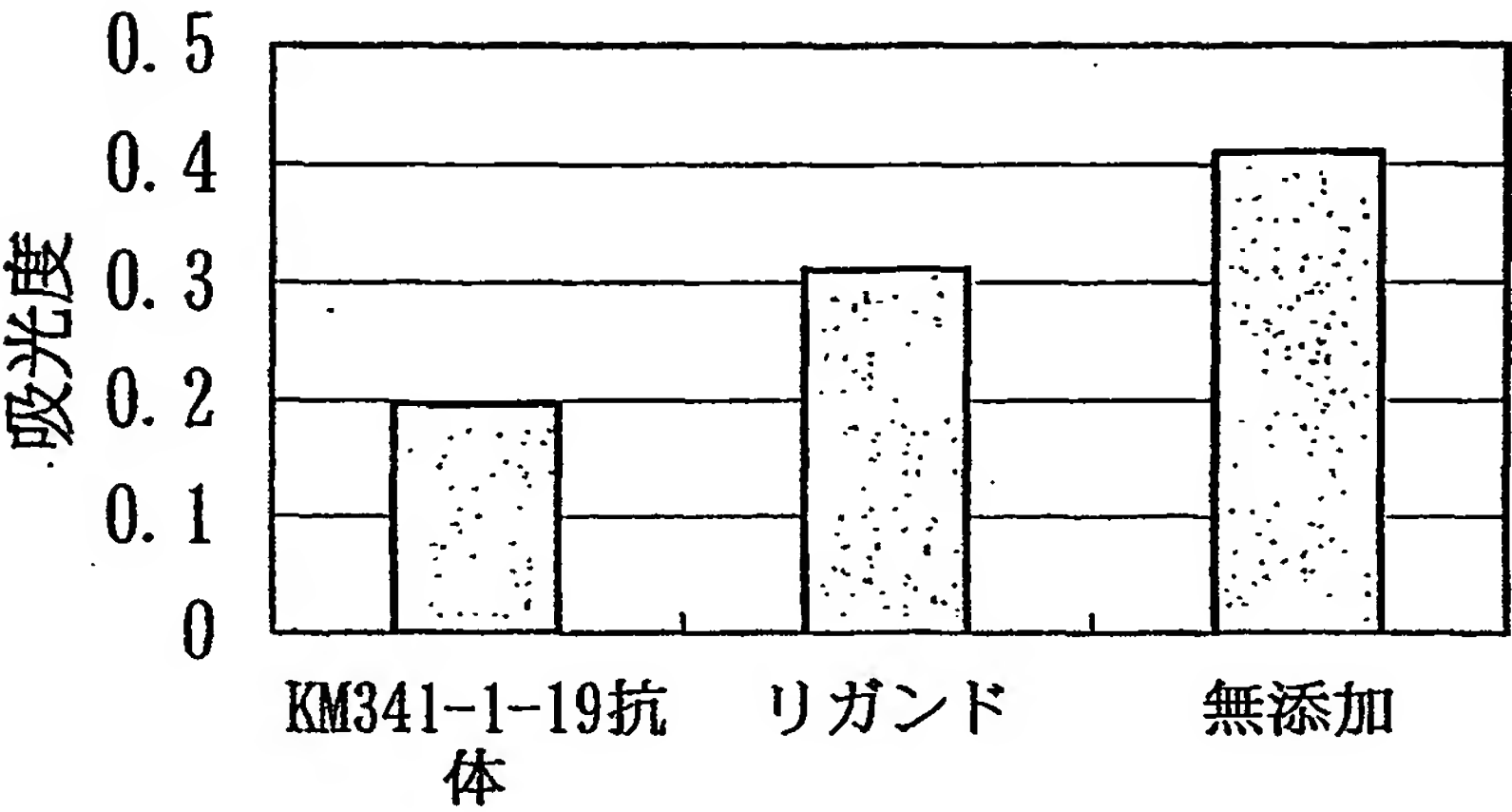


図 1 7 B

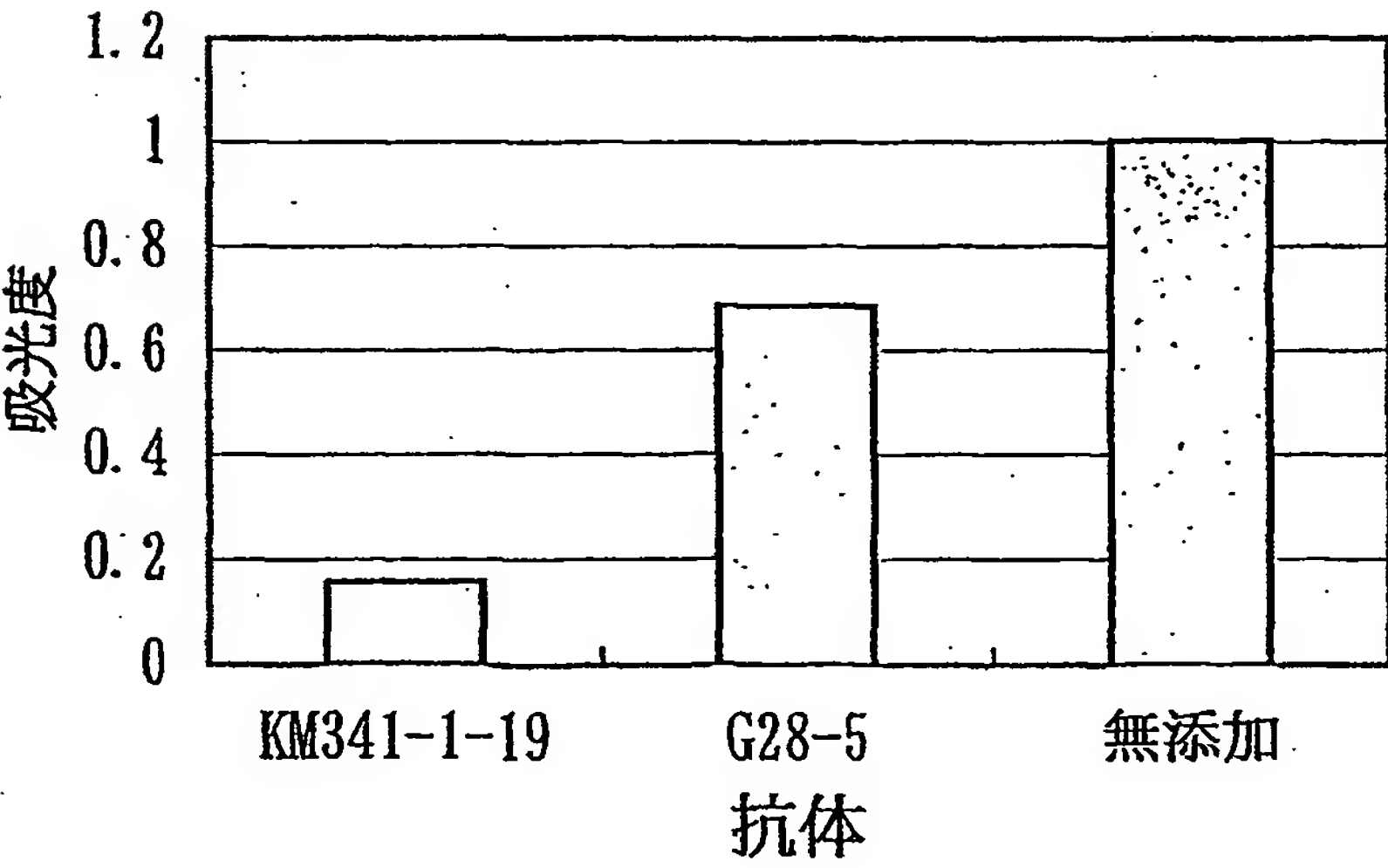


図 1 8

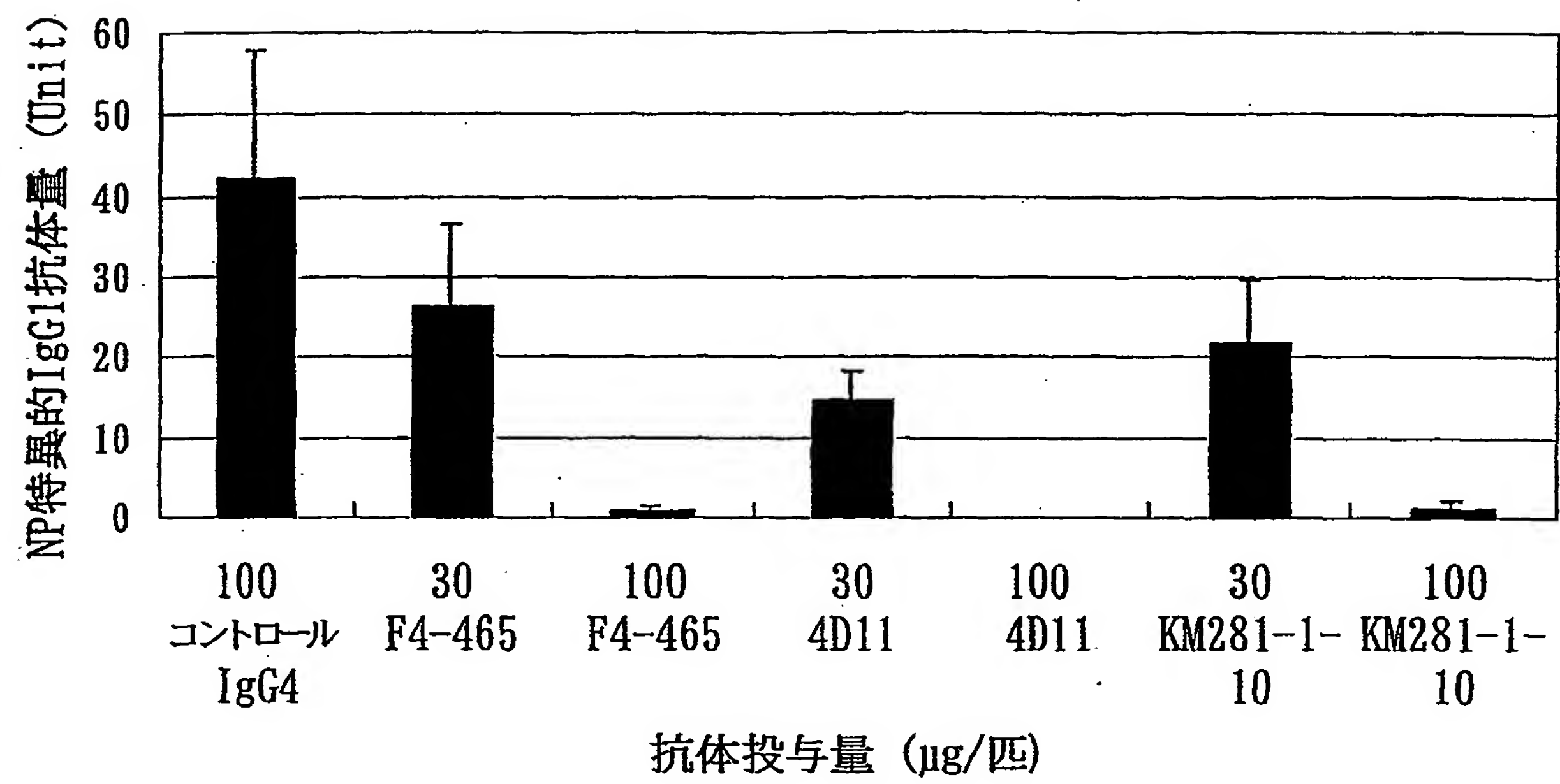




図 1 9

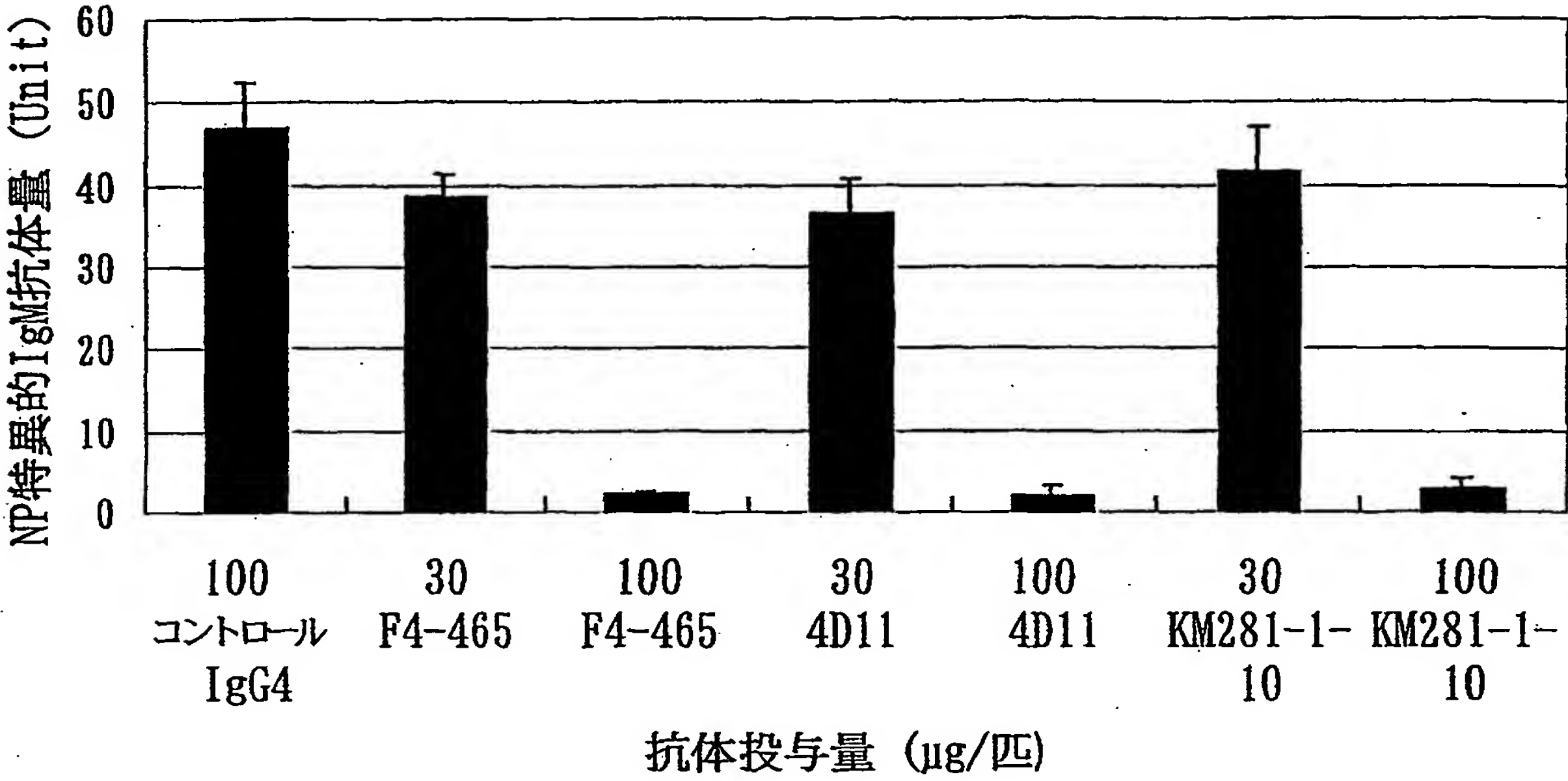
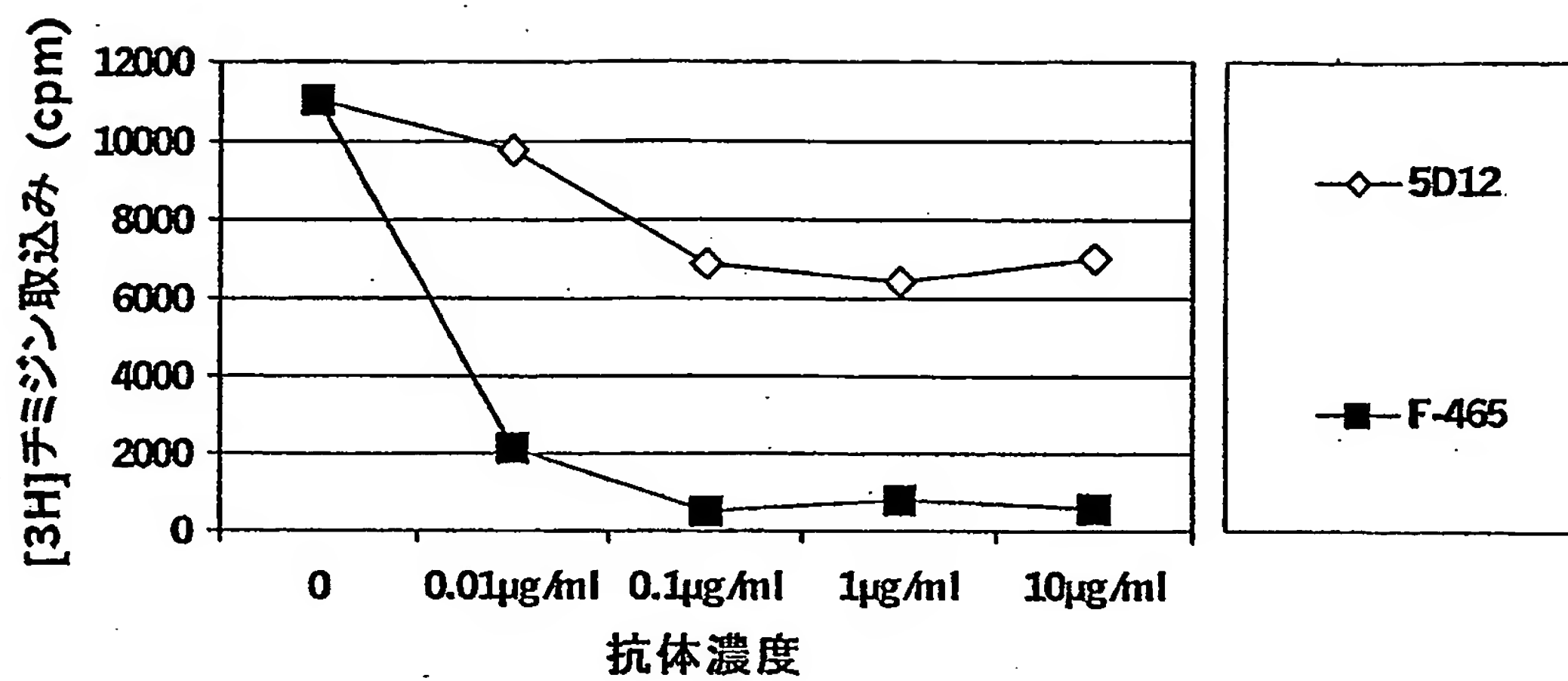


図 20



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04292

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, C12N15/13, C12N5/10, C12P21/08, A61K39/395,  
A61P35/00, A61P37/04, A61P37/06, A61P37/08, A61P7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, C12N15/13, C12N5/10, C12P21/08, A61K39/395,  
A61P35/00, A61P37/04, A61P37/06, A61P37/08, A61P7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Ledbetter, J. A. et al., Agonistic activity of a CD40-specific single-chain Fv constructed from the variable regions of mAb G28-5. Crit. Rev. Immunol., 1997, Vol.17, Nos.5 to 6, pages 427 to 435	1-16, 28, 29 27
X Y	Zhou, Z. H. et al., An agonist anti-human CD40 monoclonal antibody that induces dendritic cell formation and maturation and inhibits proliferation of a myeloma cell line. Hybridoma, Vol.18, No.6, pages 471 to 478 (1999)	1-16, 28, 29 27
X Y	de Boer, M. et al., Generation of monoclonal antibodies to human lymphocyte cell surface antigens using insect cells expressing recombinant proteins. J. Immunol. Methods, Vol.152, No.1, pages 15 to 23 (1992)	17-26, 28, 30 27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 July, 2002 (08.07.02)

Date of mailing of the international search report  
23 July, 2002 (23.07.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04292

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	Boon, L. et al., Preclinical assessment of anti-CD40 Mab 5D12 in cynomolgus monkeys. Toxicology, Vol.174, pages 53 to 65(2002)	17-26, 28, 30
Y	Tomizuka, K. et al., Double trans-chromosomic mice: Maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and Ioci and expression of fully human antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.97, No.2, pages 722 to 727(2000)	27
Y	WO 98/37757 A1 (Kirin Beer), 03 September, 1998 (03.09.98), & EP 972445 A1	27



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C07K16/28, C12N15/13, C12N5/10, C12P21/08, A61K39/395,  
A61P35/00, A61P37/04, A61P37/06, A61P37/08, A61P7/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C07K16/28, C12N15/13, C12N5/10, C12P21/08, A61K39/395,  
A61P35/00, A61P37/04, A61P37/06, A61P37/08, A61P7/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/Geneseq,  
WPI(DIALOG)、BIOSIS(DIALOG)、JICSTファイル(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Ledbetter, J. A. et al., Agonistic activity of a CD40-specific single-chain Fv	1-16, 28, 29
Y	constructed from the variable regions of mAb G28-5. Crit. Rev. Immunol., 1997, Vol.17, No.5-6, pp.427-435	27
X	Zhou, Z. H. et al., An agonist anti-human CD40 monoclonal antibody that induces	1-16, 28, 29
Y	dendritic cell formation and maturation and inhibits proliferation of a myeloma cell line. Hybridoma, Vol.18, No.6, pp.471-478 (1999)	27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.07.02

国際調査報告の発送日

23.07.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照



4B

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	de Boer, M. et al., Generation of monoclonal antibodies to human lymphocyte cell surface antigens using insect cells expressing recombinant proteins. J. Immunol. Methods, Vol.152, No.1, pp.15-23 (1992)	17-26, 28, 30
Y		27
T	Boon, L. et al., Preclinical assessment of anti-CD40 Mab 5D12 in cynomolgus monkeys. Toxicology, Vol.174, pp.53-65 (2002)	17-26, 28, 30
Y	Tomizuka, K. et al., Double trans-chromosomic mice: Maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and loci and expression of fully human antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.97, No.2, pp.722-727 (2000)	27
Y	WO 98/37757 A1 (Kirin Beer) 1998.09.03 & EP 972445 A1	27



## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 39/395, C07K 16/28, C12N 15/13</b>	<b>A3</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 99/42075</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 26 August 1999 (26.08.99)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US99/02949 <b>(22) International Filing Date:</b> 10 February 1999 (10.02.99) <b>(30) Priority Data:</b> 09/026,291 19 February 1998 (19.02.98) US <b>(71) Applicant:</b> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US). <b>(72) Inventors:</b> ARUFFO, Alejandro, A.; 33 Cheston Court, Belle Mead, NJ 08502 (US). HOLLENBAUGH, Diane; 344 Wrights Road, Newtown, PA 18940 (US). SIADAK, Anthony, W.; 6210 First Avenue, N.W., Seattle, WA 98107 (US). BERRY, Karen, K.; 180 Review Avenue, Lawrenceville, NJ 08648 (US). HARRIS, Linda, J.; 1214 16th Avenue, N.E., Seattle, WA 98112-3313 (US). THORNE, Barbara, A.; 3626 223 Avenue, S.E., Issaquah, WA 98029 (US). BAJORATH, Jurgen; 17406 37th Avenue, Lynnwood, WA 98037 (US). WU, Herren; 5255 Timber Branch Way, San Diego, CA 92130 (US). HUSE, William, D.; 1993 Zapot Street, Del Mar, CA 92014 (US). WATKINS, Jeffry, D.; 455 Jolina Way, Encinitas, CA 92024 (US).		<b>(74) Agents:</b> KLEIN, Christopher, A. et al.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US). <b>(81) Designated States:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). <b>Published</b> <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i> <b>(88) Date of publication of the international search report:</b> 14 October 1999 (14.10.99)
<b>(54) Title:</b> ANTIBODIES AGAINST HUMAN CD40 <b>(57) Abstract</b> <p>The Applicants have discovered novel chimeric and humanized anti-human CD40 antibodies which block the interaction between gp39 and CD40. The anti-CD40 antibodies of the present invention are effective in modulating humoral immune responses against T cell-dependent antigens, collagen induced arthritis, and skin transplantation, and are also useful for their anti-inflammatory properties.</p>		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US99/02949

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) :A61K 39/395; C07K 16/28; C12N 15/13

US CL :Please See Extra Sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/130.1, 133.1, 141.1, 143.1, 144.1, 153.1, 173.1; 530, 387.1, 387.3, 388.2, 388.2, 388.22, 388.7, 388.73; 536, 23,53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
NONE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, DIALOG, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, CA, GENBANK  
search terms: cd40, antibod?, humanis?, humaniz?, chimeric, 7cl

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,677,165 A (DE BOER et al.) 14 October 1997, see entire document.	1-30



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*E* earlier document published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
*I* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*g* document member of the same patent family
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

21 JULY 1999

Date of mailing of the international search report

20 AUG 1999

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

PHILLIP GAMBEL

Telephone No. (703) 308-0196

JOYCE BRIDGERS  
PARALEGAL SPECIALIST  
CHEMICAL MATRIX

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US99/02949

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

424/130.1, 133.1, 141.1, 143.1, 144.1, 153.1, 173.1; 530, 387.1, 387.3, 388.2, 388.2, 388.22, 388.7, 388.73; 536, 23,53

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKewed/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**